

Analyse von Komponenten der organellären Transkriptionsmaschinerien aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biologin Alexandra-Viola Bohne
geboren am 05.04.1972 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Markschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. rer. nat., habil Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner
 2. Prof. Dr. Wolfgang Lockau
 3. PD Dr. Thomas Pfannschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2009

Abstract

Die Gesamtheit mitochondrialer Gene sowie ein Teil der plastidären Gene photosynthetischer Eukaryoten wird durch kernkodierte Phagentyp-RNA-Polymerasen transkribiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung eines homologen *in vitro*-Transkriptionssystems, die spezifischen Funktionen der Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTm, RpoTp und RpoTmp aus Arabidopsis untersucht. Während RpoTmp keine Präferenz für die angebotenen Promotoren zeigte, transkribierten RpoTm und RpoTp eine überlappende Gruppe mitochondrialer und plastidärer Promotoren vielfältiger Architektur. RpoTm und RpoTp präsentierten hierbei eine Kofaktor-unabhängige Fähigkeit zur Promotorerkennung bei Angebot superhelikaler DNA-Matrizen. Eine selektive Promotornutzung sowie die Unfähigkeit zur spezifischen Transkription linearer Promotormatrizen *in vitro* implizieren die Assoziation zusätzlicher, in die Promotorerkennung und/oder DNA-Aufschmelzung involvierter Kofaktoren *in vivo*.

Die *in vitro*-Erkennung mitochondrialer Promotoren durch eine plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase (und umgekehrt) sowie weitere Ähnlichkeiten der Transkriptionsapparate der Mitochondrien und Plastiden, wie die strukturelle Organisation ihrer Promotoren und die phylogenetische Herkunft ihrer kernkodierten Transkriptasen inspirierte *in planta* Studien zur spezifischen Transkription eines mitochondrialen Promotors in den Plastiden. Hierzu wurde die Expression des *nptII*-Reportergens unter Kontrolle des mitochondrialen *PatpA*-Promotors aus *Oenothera* in transplastomischen Tabakpflanzen analysiert. Die durchgeführten Studien belegen eine korrekte Transkription des mitochondrialen *PatpA*-Promotors durch eine plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase in *in vitro*-Transkriptionsassays sowie in transplastomischen Tabakpflanzen. Diese Resultate enthüllen weitere unerwartete Ähnlichkeiten der organellären Genexpression, die aufschlussreiche evolutionäre Einblicke erlauben und verbesserte Anwendungen zur Manipulation plastidärer Genome ermöglichen könnten.

Schlagworte:

Organellen

Promotor

Transkription

Phagentyp-RNA-Polymerase

Abstract

All mitochondrial and a subset of plastidial genes of photosynthetically active eukaryotes are transcribed by nuclear-encoded, phage-type RNA polymerases.

In this study, a homologous *in vitro* transcription system was used to define the specific functions of Arabidopsis phage-type RNA polymerases RpoTm, RpoTp and RpoTmp in organellar transcription. RpoTmp displayed no significant promoter specificity, whereas RpoTm and RpoTp were able to accurately initiate transcription from overlapping subsets of mitochondrial and plastidial promoters of diverse architecture. RpoTm and RpoTp thereby demonstrated an intrinsic capability to recognize promoters on supercoiled DNA templates without the aid of protein cofactors. A selective promoter recognition by the phage-type RNAPs *in vitro* and the inability to recognize promoters on linear templates imply that auxiliary factors are required for efficient initiation of transcription and/or DNA melting *in vivo*.

Crosswise recognition of organellar promoters by the phage-type RNA polymerases *in vitro* as well as other similarities of the mitochondrial and plastidial transcription machineries such as promoter structures and the phylogenetic origin inspired *in planta* studies to investigate specific transcription of a mitochondrial promoter in plastids. Therefore, the expression of an *nptII* reporter gene under control of the mitochondrial *PatpA* promoter from *Oenothera* was analyzed in transplastomic tobacco plants. The data presented here demonstrate the faithful recognition of the mitochondrial *PatpA* promoter by a plastid RNA polymerase both in *in vitro* transcription assays and in transplastomic tobacco plants. These findings disclose further unexpected similarities of the organellar gene expression systems which deliver interesting evolutionary insights and might facilitate improved applications for chloroplast genome engineering.

Keywords:

Organelles

Promoter

Transcription

Phage-type RNA polymerase

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	7
SUMMARY	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
1 EINLEITUNG	13
1.1 Mitochondrien und Chloroplasten: Zellorganellen mit endosymbiontischer Herkunft	13
1.2 Die organelläre Transkription in höheren Pflanzen	15
1.2.1 Plastidäre und mitochondriale Genome	15
1.2.2 Organelläre RNA-Polymerasen	19
1.2.2.1 <i>RpoT</i> -Gene kodieren organelläre Phagentyp-RNA-Polymerasen	19
1.2.2.2 Plastidäre RNA-Polymerasen	21
1.2.3 Promotoren organellärer RNA-Polymerasen	23
1.2.3.1 Plastidäre Promotoren	23
1.2.3.2 Mitochondriale Promotoren	27
1.2.4 Transkriptionsfaktoren organellärer RNA-Polymerasen	29
1.2.4.1 Spezifitätsfaktoren der plastomkodierten eubakteriellen RNA-Polymerase (PEP)	30
1.2.4.2 Spezifitätsfaktoren kernkodierter Phagentyp-RNA-Polymerasen	30
1.2.5 Regulation der organellären Genexpression in Pflanzen auf Transkriptionsebene	33
1.2.6 Rollen der Phagentyp-RNA-Polymerasen in der organellären Gentranskription	38
1.3 Zielstellung dieser Arbeit	40
2 MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 Material	41
2.1.1 Bakterienstämme	41
2.1.2 Pflanzenmaterial	41
2.1.3 Oligonukleotide	41
2.1.4 Computerprogramme	42
2.1.5 Anbieter	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Pflanzenanzucht	43
2.2.2 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> -Kulturen	43
2.2.3 Nukleinsäuren	43
2.2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	43
2.2.3.1.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus Arabidopsis	43
2.2.3.1.2 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	43
2.2.3.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA und Chloroplasten-RNA aus Arabidopsis und Tabak	44
2.2.3.1.4 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	44
2.2.3.2 Elektrophorese von Nukleinsäuren	44
2.2.3.2.1 Agarosegelelektrophorese von DNA	44
2.2.3.2.2 Agarosegelelektrophorese von RNA	44
2.2.3.2.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von RNA	45
2.2.3.2.4 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von DNA	45
2.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
2.2.3.4 cDNA-Synthese und RT-PCR	46
2.2.3.5 Klonierung	46
2.2.3.6 Transformation von <i>E. coli</i>	46
2.2.3.7 Sequenzierung	46
2.2.3.8 5'-RACE Analyse <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> synthetisierter RNA-Transkripte	47
2.2.4 Chloroplastenpräparation und <i>Run On</i> -Transkription	49

2.2.5	Proteinarbeitstechniken	51
2.2.5.1	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine	51
2.2.5.1.1	Plasmide zur Expression rekombinanter Proteine	51
2.2.5.1.2	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	52
2.2.5.1.2.1	Expression rekombinanter RNA-Polymerasen mit dem pBAD-Thio-Expressionssystem (Thio-(His) ₆ -AtRpoTm/mp/p)	52
2.2.5.1.2.2	Expression rekombinanter RNA-Polymerasen mit dem pCOLD-Expressionssystem ((His) ₆ -AtRpoTm/mp/p)	52
2.2.5.1.2.3	Expression von rekombinantem MetC mit dem pPROtet-Expressionssystem ((His) ₆ -MetC)	53
2.2.5.1.2.4	Expression von rekombinantem Sig1 mit dem pTrc-Expressionssystem ((His) ₆ -Sig1)	53
2.2.5.1.3	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	53
2.2.5.1.3.1	Thio-(His) ₆ -AtRpoTs und (His) ₆ -AthRpoTs	53
2.2.5.1.3.2	(His) ₆ -MetC und (His) ₆ -Sig1	55
2.2.5.2	Proteinanalyse	55
2.2.5.2.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	55
2.2.5.2.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.2.5.2.3	Membrantransfer von Proteinen und Immunodetektion	56
2.2.6	Elektrophoretischer Mobilitätsassay (EMSA)	57
2.2.6.1	Radioaktive Markierung von tRNAs	57
2.2.6.2	tRNA-Bindeassay	57
2.2.7	<i>In vitro</i> Transkription	58
2.2.7.1	<i>In vitro</i> -Transkriptionsmatrizen	58
2.2.7.1.1	Konstruktion von Promotorplasmiden	58
2.2.7.1.2	Synthese aufgeschmolzener Promotormatrizen	61
2.2.7.1.3	Topoisomerase-Behandlung von Promotorkonstrukten	61
2.2.7.1.4	Synthese von RNA-Matrizen	62
2.2.7.2	<i>In vitro</i> -Synthese von Arabidopsis tRNAs	62
2.2.7.3	<i>In vitro</i> -Transkriptionsassay	63
3	ERGEBNISSE	64
3.1	<i>In vitro</i>-Transkription organellärer Promotoren durch Phagentyp-RNA-Polymerasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
3.1.1	Das <i>in vitro</i> -Transkriptionssystem	64
3.1.2	Selektive Erkennung mitochondrialer Promotoren durch Phagentyp-RNA-Polymerasen <i>in vitro</i>	66
3.1.3	Selektive Erkennung plastidärer Promotoren durch Phagentyp-RNA-Polymerasen <i>in vitro</i>	74
3.1.4	<i>In vitro</i> -Studien zur Transkription plastidärer tRNA-Gene	77
3.1.5	Promotoranalysen mit rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen im <i>in vitro</i> -Transkriptionssystem	79
3.1.5.1	Deletionsanalyse organellärer Promotoren	79
3.1.5.2	RpoTm und RpoTp erkennen ein konserviertes Promotorkernelement	83
3.1.6	Abhängigkeit der Promotorerkennung von der DNA-Konformation	89
3.1.7	<i>In vitro</i> -Transkription linearer DNA-Matrizen an aufgeschmolzenen Promotorsequenzen	91
3.1.8	Unveränderte Promotorspezifität hochaufgereinigter rekombinanter Phagentyp-RNA-Polymerasen	94
3.1.9	Untersuchung potentieller Transkriptionsfaktoren der Phagentyp-RNA-Polymerasen	95
3.1.10	Untersuchung der Terminatorfunktion des 3'-UTRs des mitochondrialen <i>atp9</i> -Gens	98
3.1.11	RpoT-Inhibitorstudien	100
3.1.11.1	Untersuchung der inhibitorischen Wirkung des T7/SP6-RNA-Polymerase-Inhibitors Cyclothiazomycin B1	100
3.1.11.2	Untersuchungen zur Regulation der Phagentyp-RNA-Polymerase-Aktivität durch tRNA ^{Glu}	102
3.1.12	RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität der RpoT-Polymerasen	105
3.2	Transkription eines mitochondrialen Promotors in transgenen Plastiden	107
3.2.1	Erkennung des mitochondrialen <i>PatpA</i> Promotors durch eine plastidäre und eine mitochondriale Phagentyp-RNA-Polymerase <i>in vitro</i>	108
3.2.2	Expression eines mitochondrialen Promotors in Plastiden <i>in planta</i>	109

4	DISKUSSION	114
4.1	Transkriptionelle Rollen der organellären Phagentyp-RNA-Polymerasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	114
4.1.1	Intrinsische Promotorspezifität von RpoTm und RpoTp	114
4.1.2	Selektive Promotorerkennung durch RpoTm und RpoTp	116
4.1.3	Unterschiedliche transkriptionelle Eigenschaften der Phagentyp-RNA-Polymerasen	119
4.2	Regulation der Aktivität pflanzlicher Phagentyp-RNA-Polymerasen	123
4.2.1	Variable <i>in vitro</i> -Transkriptionsraten mitochondrialer Promotoren werden durch die Promotorstärke bestimmt	123
4.2.2	RpoTs benötigen zusätzliche Transkriptionsfaktoren <i>in vivo</i>	125
4.2.3	Regulation der NEP-Aktivität	129
4.3	Ähnlichkeiten der Genexpressionssysteme in Chloroplasten und Mitochondrien	132
5	LITERATURVERZEICHNIS	138
6	ANHANG	166
	WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	167
	DANKSAGUNG	168
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	169

ZUSAMMENFASSUNG

Die Gesamtheit mitochondrialer Gene sowie ein Teil der plastidären Gene photosynthetischer Eukaryoten wird durch kernkodierte Phagentyp-RNA-Polymerasen transkribiert. Die Kerngenome höherer Pflanzen kodieren für kleine Familien von Phagentyp-RNA-Polymerasen (RpoT-Polymerasen), die phylogenetisch mit den RNA-Polymerasen aus den T3/T7-Bakteriophagen verwandt sind. Die dikotyle Pflanze *Arabidopsis thaliana* besitzt drei *RpoT*-Gene, *RpoTm*, *RpoTmp* und *RpoTp*, deren Produkte in den Mitochondrien (*RpoTm* und *RpoTmp*) und den Plastiden (*RpoTp* und *RpoTmp*) lokalisiert sind. Obwohl angenommen wird, dass diese RNA-Polymerasen in den Organellen als katalytische Komponenten der organellären Transkriptionsapparate fungieren, sind ihre spezifischen Funktionen weitestgehend ungeklärt und es existieren nur wenige Hinweise auf assoziierte transkriptionelle Kofaktoren und regulatorische Elemente. Bislang wurden die Eigenschaften der Transkriptionsapparate meist über die Analyse *in vivo* synthetisierter Transkripte von Wildtyp- oder mutanten Pflanzen oder durch detaillierte *in vitro*-Untersuchung plastidärer oder mitochondrialer Extrakte charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung eines definierten, homologen *in vitro*-Transkriptionssystems, welches aus rekombinanten Proteinkomponenten und Matrizen organellärer Promotoren besteht, die minimale Zusammensetzung eines für die Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation notwendigen Phagentyp-RNA-Polymerasekomplexes bestimmt werden. Es konnte demonstriert werden, dass es sich bei allen drei Enzymen um transkriptionell aktive RNA-Polymerasen handelt. Während *RpoTmp* in *in vitro*-Transkriptionsstudien keine Präferenz für die angebotenen organellären Promotoren zeigte, transkribierten *RpoTm* und *RpoTp* eine überlappende Gruppe mitochondrialer und plastidärer Promotoren vielfältiger Architektur. *RpoTm* und *RpoTp* präsentierten hierbei eine intrinsische, Kofaktor-unabhängige Fähigkeit zur Promotorerkennung bei Angebot superhelikaler DNA-Matrizen. Im Gegensatz zur T7-RNA-Polymerase waren *RpoTm* und *RpoTp* jedoch nicht in der Lage Promotoren von linearen Matrizen spezifisch zu transkribieren. Die selektive Promotornutzung sowie die Unfähigkeit zur spezifischen Transkription linearer Promotormatrizen *in vitro* implizieren die Assoziation zusätzlicher, in die Promotorerkennung und/oder DNA-Aufschmelzung involvierter Kofaktoren *in vivo*. Darüber hinaus erwies sich das etablierte *in vitro*-System als wertvolles Instrument zur vergleichenden Analyse der transkriptionellen Eigenschaften der drei organellären Phagentyp-Polymerasen aus *Arabidopsis* und ermöglichte die Untersuchung potentieller Kofaktoren sowie regulatorischer und mechanistischer Komponenten der organellären Genexpression.

Die *in vitro*-Erkennung mitochondrialer Promotoren durch eine plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase (und umgekehrt) sowie weitere Ähnlichkeiten der Transkriptionsapparate der Mitochondrien und Plastiden, wie die strukturelle Organisation ihrer Promotoren und die phylogenetische Herkunft ihrer kernkodierten Transkriptasen inspirierte *in planta* Studien zur spezifischen Transkription eines mitochondrialen Promotors in den Plastiden. Hierzu wurde die Expression des *nptII*-Reportergens unter Kontrolle des mitochondrialen *PatpA*-Promotors aus *Oenothera* in transplastomischen Tabakpflanzen analysiert. Die durchgeführten Studien belegen eine korrekte Transkription des mitochondrialen *PatpA*-Promotors durch eine plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase in *in vitro*-Transkriptionsassays sowie in transplastomischen Tabakpflanzen. Die Kartierung des *nptII*-Transkript-5'-Endes zeigte eine korrekte Erkennung des *PatpA*-Promotors durch die plastidäre Transkriptionsmaschinerie *in vivo*. Interessanterweise präsentierten *Run On*-Analysen mit isolierten Chloroplasten, dass das chimäre *nptII*-Gen in isolierten Plastiden sogar effizienter transkribiert wurde als vergleichend analysierte NEP-abhängige Gene. Diese Resultate enthüllen weitere unerwartete Ähnlichkeiten der organellären Genexpression, die aufschlussreiche evolutionäre Einblicke erlauben und verbesserte Anwendungen zur Manipulation plastidärer Genome ermöglichen könnten.

SUMMARY

All mitochondrial and a subset of plastidial genes of photosynthetically active eukaryotes are transcribed by nuclear-encoded, phage-type RNA polymerases. Nuclear genomes of higher plants encode for a small family of phage-type RNA polymerases (RpoT polymerases) which are phylogenetically related to the ones of T3/T7 bacteriophages. The dicotyledonous plant *Arabidopsis thaliana* possesses three RpoT genes, *RpoTm*, *RpoTmp* and *RpoTp*, whose products are localized to mitochondria (RpoTm und RpoTmp) and plastids (RpoTp und RpoTmp). Although the RpoT polymerases are thought to represent catalytic components of the organellar transcription machineries, their specific functions are as yet unresolved and there is only little indication for associated transcriptional cofactors and regulatory elements. So far, the properties of transcriptional machineries have been characterized by analysis of *in vivo* synthesized transcripts of wild type or mutant plants or by detailed investigation of the transcriptional characteristics of plastidial or mitochondrial extracts.

In this study, a defined homologous *in vitro* transcription system composed of individual recombinant components and organellar promoter templates was established to define the minimal phage-type RNA polymerase complexes capable of both promoter recognition and transcription initiation. All three RpoT genes were shown to encode transcriptionally active RNAPs. RpoTmp displayed no significant promoter specificity, whereas RpoTm and RpoTp were able to accurately initiate transcription from overlapping subsets of mitochondrial and plastidial promoters of diverse architecture. RpoTm and RpoTp thereby demonstrated an intrinsic capability to recognize promoters on supercoiled DNA templates without the aid of protein cofactors. Unlike the T7 RNAP, RpoTm and RpoTp were not able to transcribe promoters from linear templates. Selective promoter recognition by the phage-type RNAPs *in vitro* and the inability to recognize promoters on linear templates imply that auxiliary factors are required for efficient initiation of transcription and/or DNA melting *in vivo*. Moreover, the established *in vitro* transcription system turned out to be a useful tool for a comparative analysis of the transcriptional properties of the three organellar *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases and enabled the testing of potential cofactors, regulatory, and mechanistic components of organellar gene expression.

Crosswise recognition of organellar promoters by the phage-type RNA polymerases *in vitro* as well as other similarities of the mitochondrial and plastidial transcription machineries such as promoter structures and the phylogenetic origin inspired *in planta* studies to investigate specific transcription of a mitochondrial promoter in plastids. Therefore, the expression of an

nptII reporter gene under control of the mitochondrial *PatpA* promoter from *Oenothera* was analyzed in transplastomic tobacco plants. The data presented here demonstrate the faithful recognition of the mitochondrial *PatpA* promoter by a plastid RNA polymerase both in *in vitro* transcription assays and in transplastomic tobacco plants. Mapping of the 5'-ends of the *nptII* transcripts revealed accurate recognition of the *PatpA* promoter by the chloroplast transcription machinery *in vivo*. Interestingly, run-on assays with isolated chloroplasts showed that the chimeric *nptII* gene was even more efficiently transcribed than other NEP-dependent genes. These findings disclose further unexpected similarities of the organellar gene expression systems which deliver interesting evolutionary insights and might facilitate improved applications for chloroplast genome engineering.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
(d)ATP	(Desoxy) Adenosintriphosphat
AS	Aminosäurerest
BLAST	<i>Basic alignment search tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
(μ)Ci	(Mikro) Curie
Cm	Chloramphenicol
cpDNA	plastidäres Genom
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
(d)CTP	(Desoxy) Cytosintriphosphat
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	N,N-Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
G	Guanin
g	Gramm
(d)GTP	(Desoxy) Guanosintriphosphat
h	Stunde
His	Histidin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MS-Medium	Murashige und Skoog Medium
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	mitochondriales Genom
NEP	nukleärcodierte (plastidäre) RNA-Polymerase
nt	Nukleotid(e)
(d)NTP	(Desoxy) Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEP	plastidär kodierte (plastidäre) RNA-Polymerase

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly(dI-dC)	synthetisches Polymer zusammengesetzt aus alternierenden Inosin-Cytosin-Nukleotiden
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RpoT	RNA-Polymerase vom T7/T3-Typ
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAP	<i>tobacco acid pyrophosphatase</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
(d)TTP	(Desoxy) Thymidintriphosphat
Trx	Thioredoxin
U	Uracil, Unit
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultra violett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Mitochondrien und Chloroplasten: Zellorganellen mit endosymbiontischer Herkunft

Mitochondrien und Chloroplasten stammen von zuvor frei lebenden Bakterien ab, die von einer frühen eukaryotischen Zelle aufgenommen wurden [Herrmann, 1997; Martin und Herrmann, 1998; McFadden, 2001; Mereschowsky, 1905]. Analysen plastidärer und mitochondrialer Genome zeigten, dass sich die Mitochondrien aus einem Vorfahren, dessen nächster gegenwärtiger Verwandter in der Gruppe der α -Proteobakterien zu finden ist, entwickelten [Yang et al., 1985], die Chloroplasten aus Cyanobakterien-ähnlichen Prokaryoten [Bonen und Doolittle, 1975; Buetow, 1976; Schwartz und Dayhoff, 1978]. Im Verlauf der Evolution der verschiedenen Linien eukaryotischer Organismen haben die Endosymbionten ihre Eigenständigkeit verloren und wurden zu den heute bekannten Organellen. Multiple Gentransferereignisse von den Genomen der Endosymbionten in den Zellkern des Wirts, Gensubstitutionen und der vollkommene Verlust organellärer Gene führten zu einer drastischen Reduktion der plastidären und mitochondrialen Genome (Abbildung 1:), wodurch eine genetische und biochemische Abhängigkeit der einzelnen getragenden Kompartimente in der Zelle entstand [Gray, 1992; Gray, 1999; Herrmann, 1997; Martin, 2003; Martin und Herrmann, 1998; Martin et al., 2002; Timmis et al., 2004]. Während die Reduktion des mitochondrialen Genoms von tierischen Lebewesen scheinbar bereits im gemeinsamen Vorfahren abgeschlossen wurde [Boore, 1999], ist in Pflanzen der Transfer organellärer Gene in den Zellkern ein noch fortwährender Prozess [Adams et al., 2000; Adams et al., 2002; Adams et al., 1999; Herrmann, 2003; Leister, 2005; Timmis et al., 2004].

Der Metabolismus und der genetische Apparat beider Organellen weisen noch heute deutliche Merkmale prokaryotischen Herkunft auf, doch die Koevolution der drei Genome (nukleäres, mitochondriales und plastidäres) führte nicht nur zu einer Neuverteilung der Gene, sondern auch der Genprodukte, so dass heute typische eukaryotische Genprodukte die Funktion von Komponenten bakterieller Herkunft übernommen haben. Vergleichende genetische Studien plastidärer Genome zeigen, dass diese für lediglich 60-200 Proteine kodieren, wogegen sich 1000-5000 kernkodierte Genprodukte in den Plastiden höherer Pflanzen finden [Abdallah et al., 2000; Martin et al., 2002; Richly und Leister, 2004]. Entsprechende Analysen mitochondrialer Genome deuten ebenfalls auf einen Import von 1000 oder mehr kernkodierten Genprodukten in das funktionale Mitochondrium hin [Millar et al., 2004]. Hierzu werden die

kernkodierten Komponenten nach ihrer Transkription im Zellkern im Cytoplasma synthetisiert und über N-terminale Transitsequenzen in die Organellen transportiert [Herrmann, 2003; Martin und Herrmann, 1998]. Viele Protein-Komplexe in den Organellen, wie z. B. die mitochondriale ATP-Synthase oder die RubisCO der Chloroplasten, werden so zum Teil aus kernkodierten, zum Teil aus organellärkodierten Untereinheiten zusammengesetzt.

In den gegenwärtigen Organismen erfüllen die Organellen spezialisierte Funktionen innerhalb der Zelle. Die Mitochondrien sind der Ort der zellulären Atmung, wobei in energieumwandelnden Prozessen durch die Kopplung von Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung ATP erzeugt wird [Saraste, 1999]. Die Chloroplasten erfüllen vor allem die Funktion der Photosynthese, sind aber auch Orte des Aminosäure-, Fettsäure- und Lipidstoffwechsels, der Nitrat- und Sulfatassimilation, der Biosynthese von Carotenoiden und Tetrapyrrolen und der Synthese von Pflanzenhormonen, Nukleotiden und Vitaminen.

Die Koordinierung dieses umfangreichen Stoffwechselgeschehens innerhalb der Pflanzenzelle erfordert eine zelltyp-, entwicklungs- und umweltabhängige Regulation der Genexpression in den einzelnen getragenden Kompartimenten. Es ist demnach von großem Interesse, Protein-komponenten des Transkriptionsapparates zu identifizieren und charakterisieren, durch die eine solche Regulation vermittelt und ein koordiniertes Zusammenspiel der einzelnen Genome innerhalb der Zelle gewährleistet wird.

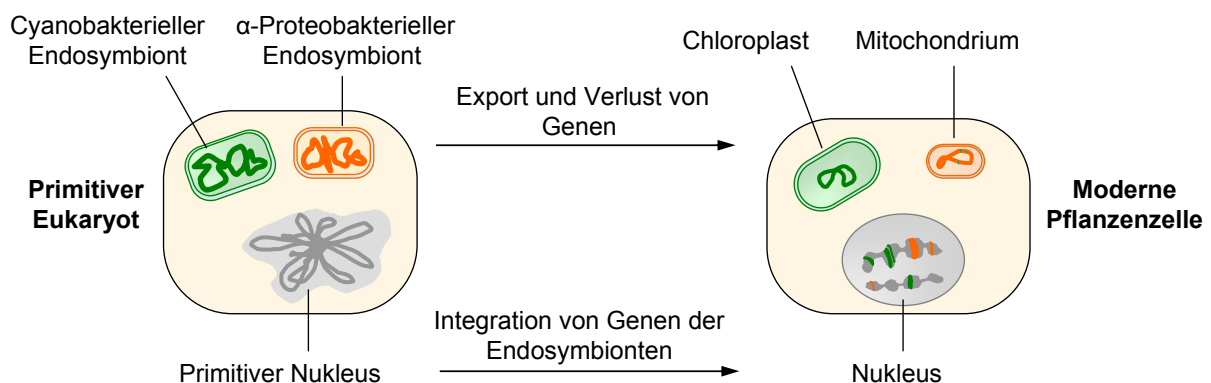


Abbildung 1: Endosymbiontische Herkunft von Chloroplasten und Mitochondrien. Der cyanobakterielle und der α -proteobakterielle Endosymbiont wurden durch unabhängige Phagozytosevorgänge in die Wirtszelle aufgenommen. Massiver Gentransfer aus den Genomen der Endosymbionten in den Wirtskern und Genverlust führten zu drastisch reduzierten organellären Genomen (cpDNA in grün, mtDNA in orange). Die Integration endosymbiontischer Gene in das Wirtsgenom sowie ursprünglich plastidärer tRNA-Gene in das mitochondriale Genom ist farblich angedeutet.

1.2 Die organelläre Transkription in höheren Pflanzen

1.2.1 Plastidäre und mitochondriale Genome

Die Genome der Plastiden (Plastome, cpDNA) stellen wie diejenigen der Mitochondrien (Chondrome, mtDNA) Überreste der Genome ihrer durch Endosymbiose aufgenommenen eubakteriellen Vorfahren dar.

Die plastidären Genome der Landpflanzen sind sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Struktur hoch konserviert [Wakasugi et al., 2001]. Typische plastidäre Chromosomen höherer Pflanzen weisen, abhängig vom Organismus, eine Größe von etwa 120- 160 kb auf und beinhalten 60-200 Gene, die hauptsächlich für Bestandteile des Transkriptions- und Translationsapparates, sowie für Komponenten des Photosyntheseapparates kodieren [Maier und Schmitz-Linneweber, 2004]. Es wurde bislang angenommen, dass das plastidäre Genom ausschließlich als doppelsträngiges zirkuläres Molekül in den Chloroplasten vorliegt [Herrmann et al., 1975; Kolodner und Tewari, 1972; Übersicht in Maier und Schmitz-Linneweber, 2004]. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass die cpDNA zudem in multimerer, linearer und komplex-verzweigter Form auftritt [Bendich, 2004; Oldenburg und Bendich, 2004]. Die cpDNA der meisten photosynthetischen Organismen lässt gemeinsame charakteristische Strukturmerkmale erkennen: zwei invertierte Sequenzwiederholungsbereiche (*inverted repeats*, IRs), die einen kleinen Einzelkopiebereich (*small single copy*, SSC) und einen großen Einzelkopiebereich (*long single copy*, LSC) voneinander trennen und die Gene für ribosomale RNAs tragen (Abbildung 2). Die variierenden Plastomgrößen unterschiedlicher Organismen lassen sich meist auf verschiedene Längen der IR-Regionen zurückführen.

Die Gene sind oft in polycistronischen Transkriptionseinheiten organisiert, die unterschiedliche Orientierungen aufweisen [Übersicht in Sugita und Sugiyura, 1996]. Anders als in prokaryotischen Organismen wird die Vorläufer-RNA in den Chloroplasten posttranskriptionell in mono- und oligocistronische RNAs prozessiert [Barkan, 1988; Barkan, 2004; Sugita und Sugiyura, 1996] und beinhaltet gelegentlich nicht-kodierende Intronbereiche innerhalb der Gene, die durch verschiedene Spleißmechanismen entfernt werden [Übersicht in Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007].

Ähnlich den bakteriellen Chromosomen, ist die plastidäre DNA in Protein-DNA-Komplexen, den Nukleoiden, organisiert [Übersicht in Sato et al., 2003]. Sich entwickelnde und reife Chloroplasten beinhalten mehrere Nukleoide, von denen jedes mehrere Genomkopien aufweist. Das Proteinmuster isolierter Nukleoide aus den Chloroplasten höherer Pflanzen lässt auf etwa 20-50 verschiedene Proteine schließen [Übersichten in Heinhorst et al., 2004; Phin-

ney und Thelen, 2005], von denen bislang jedoch nur wenige charakterisiert wurden. Als Nukleoid-kompaktierendes Protein konnte in Rotalgen das plastidärkodierte, histonähnliche DNA-Bindeprotein HU identifiziert werden [Kobayashi et al., 2002]. In den Plastiden der Pflanzen scheint die Kompaktierung dagegen durch eine Sulfireduktase (SiR) vermittelt zu werden [vgl. Kap. 1.2.5, Sato et al., 2001; Sato et al., 2003].

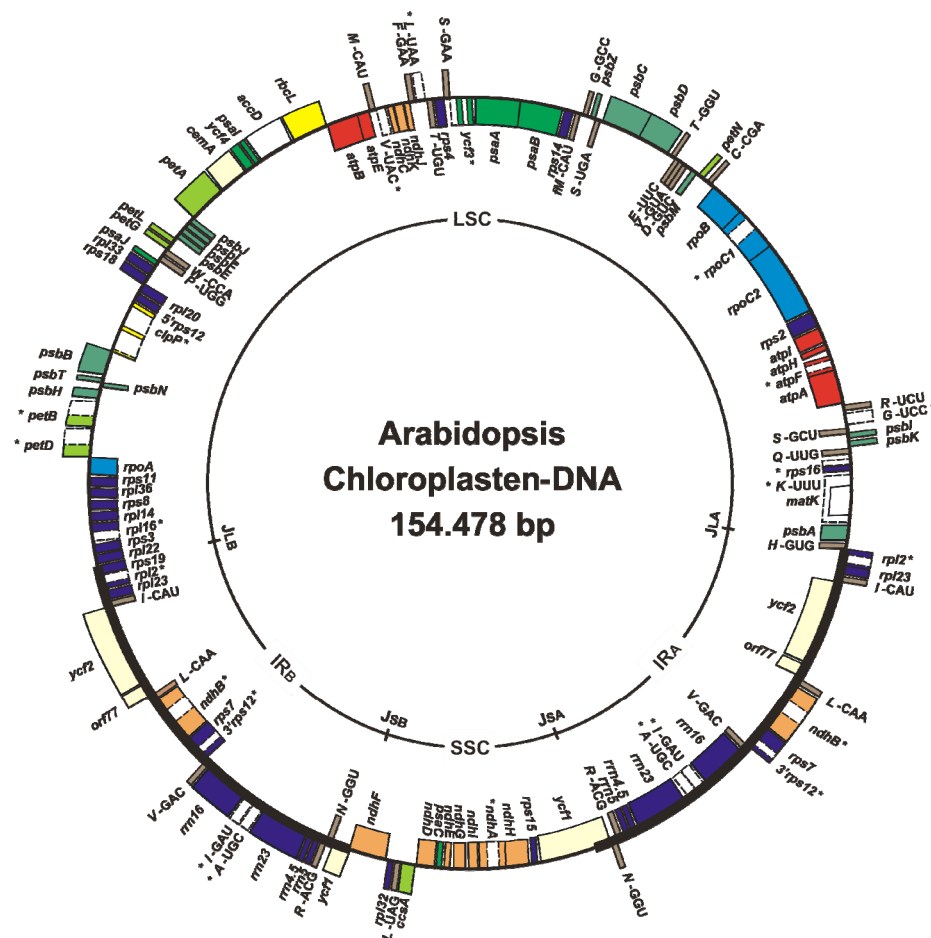


Abbildung 2: Organisation des plastidären Genoms von *Arabidopsis thaliana*. Das 154 kb große Genom ist in zwei identische, gegenläufige Sequenzabfolgen (*inverted repeats*, IR_A und IR_B, fett gezeichnete Randbereiche) von 26 kb Länge organisiert, die durch einen kleinen (SSC, 17 kb) und einen großen (LSC, 84 kb) Einzelkopiebereich voneinander getrennt sind. Die tRNA-, rRNA- und proteinkodierenden Gene sowie offene Leseraster sind entsprechend ihrer biologischen Funktion durch Boxen unterschiedlicher Farbe beiderseits des äußeren Ringes gekennzeichnet. Die Gene außerhalb des Ringes werden gegen den Uhrzeigersinn transkribiert, die Gene innerhalb des Ringes im Uhrzeigersinn. Gene mit Introns sind mit Sternchen gekennzeichnet, dabei ist die Position und die Länge der Introns gestrichelt dargestellt. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Swiatecka-Hagenbruch.

Im Gegensatz zu plastidären Genomen zeigen die Genome pflanzlicher Mitochondrien bei einer relativ konstanten Anzahl von 50-60 Genen [Handa, 2003; Kubo et al., 2000; Notsu et al., 2002; Sugiyama et al., 2005; Unseld et al., 1997] eine beträchtliche Varianz in ihrer Größe. Die Gene, die vornehmlich für Komponenten der Atmungskette und des Translationsapparates kodieren, treten wie plastidäre Gene verstreut oder in Genclustern organisiert auf (vgl. Abbildung 3) und werden posttranskriptionell prozessiert [Übersicht in Gagliardi und Binder, 2007].

Weitere Ähnlichkeiten zu plastidären Genen finden sich im Auftreten zahlreicher Gruppe II-Introns in mitochondrialen proteinkodierenden Genen, die durch Spleißvorgänge aus der Vorläufer-RNA entfernt werden [Übersicht in Gagliardi und Binder, 2007], sowie C nach U-Edierungsvorgängen, welche jedoch in Mitochondrien deutlich häufiger auftreten [Giegé und Brennicke, 1999; Handa, 2003; Mulligan, 2004; Notsu et al., 2002].

Die mitochondrialen Genomgrößen erstrecken sich von 187 kb in *Marchantia polymorpha* über 570 kb in *Zea mays* und bis hin zu 2400 kb in bestimmten *Cucurbitaceen* [Ward et al., 1981]. Im Vergleich dazu weisen die Mitochondrien tierischer Organismen ein deutlich kleineres Chondrom auf, obwohl dieses nicht für entsprechend weniger Gene kodiert [Übersichten in Bullerwell und Gray, 2004; Burger et al., 2003]. Die Chondrome der Angiospermen besitzen große intergenische Regionen und haben sich durch zahlreiche Duplikationsereignisse, die Insertion von Introns und DNA-Sequenzen aus dem Chloroplasten- und Kerngenom sowie von Sequenzen bislang unbekannter Herkunft vergrößert [Marienfeld et al., 1999; Palmer et al., 2000]. Die schnelle strukturelle Evolution der pflanzlichen mitochondrialen Genome wird vor allem durch Rekombinationsvorgänge zwischen kleinen und großen Sequenzwiederholungsbereichen hervorgerufen und steht im Kontrast zu einer langsamen Veränderung der mtDNA-Sequenz [Palmer, 1990]. Obwohl das mitochondriale Genom in der Regel als sogenannter *master circle* mit der vollständigen genetischen Information dargestellt wird (vgl. Abbildung 3), führt die rekombinatorische Aktivität oftmals zum Auftreten subgenomischer, linearer und verzweigter mtDNA-Formen [Andre et al., 1992; Backert et al., 1997; Fauron et al., 1995; Sugiyama et al., 2005].

Ähnlich der Organisation plastidärer DNA scheint die mitochondriale DNA in chromatinähnlichen Nukleoiden vorzuliegen. Es konnte gezeigt werden, dass isolierte pflanzliche Nukleotide transkriptionell aktiv und *in vitro* zur DNA-Synthese fähig sind, wodurch angenommen wird, dass es sich bei den Nukleoiden um Orte des DNA-Erhalts und der Genexpression handelt [Dai et al., 2005; Fey et al., 1999]. Die Proteinkomponenten pflanzlicher mitochondrialer Nukleotide sind weitestgehend unbekannt, jedoch konnte in Protein-mtDNA-Komplexen des

Menschen, der Hefe und aus *Xenopus laevis* ein hoch abundantes HMG (*high mobility group*)-Protein identifiziert werden [Alam et al., 2003; Antoshechkin und Bogenhagen, 1995; Diffley und Stillman, 1992; Shen und Bogenhagen, 2001]. Dieses, als mtTFA bezeichnete Protein, ist an der mtDNA-Erhaltung beteiligt und fungiert im Menschen zudem als obligatorischer Transkriptionsfaktor der mitochondrialen Genexpression [vgl. Kap. 1.2.4, Diffley und Stillman, 1991; Kanki et al., 2004].

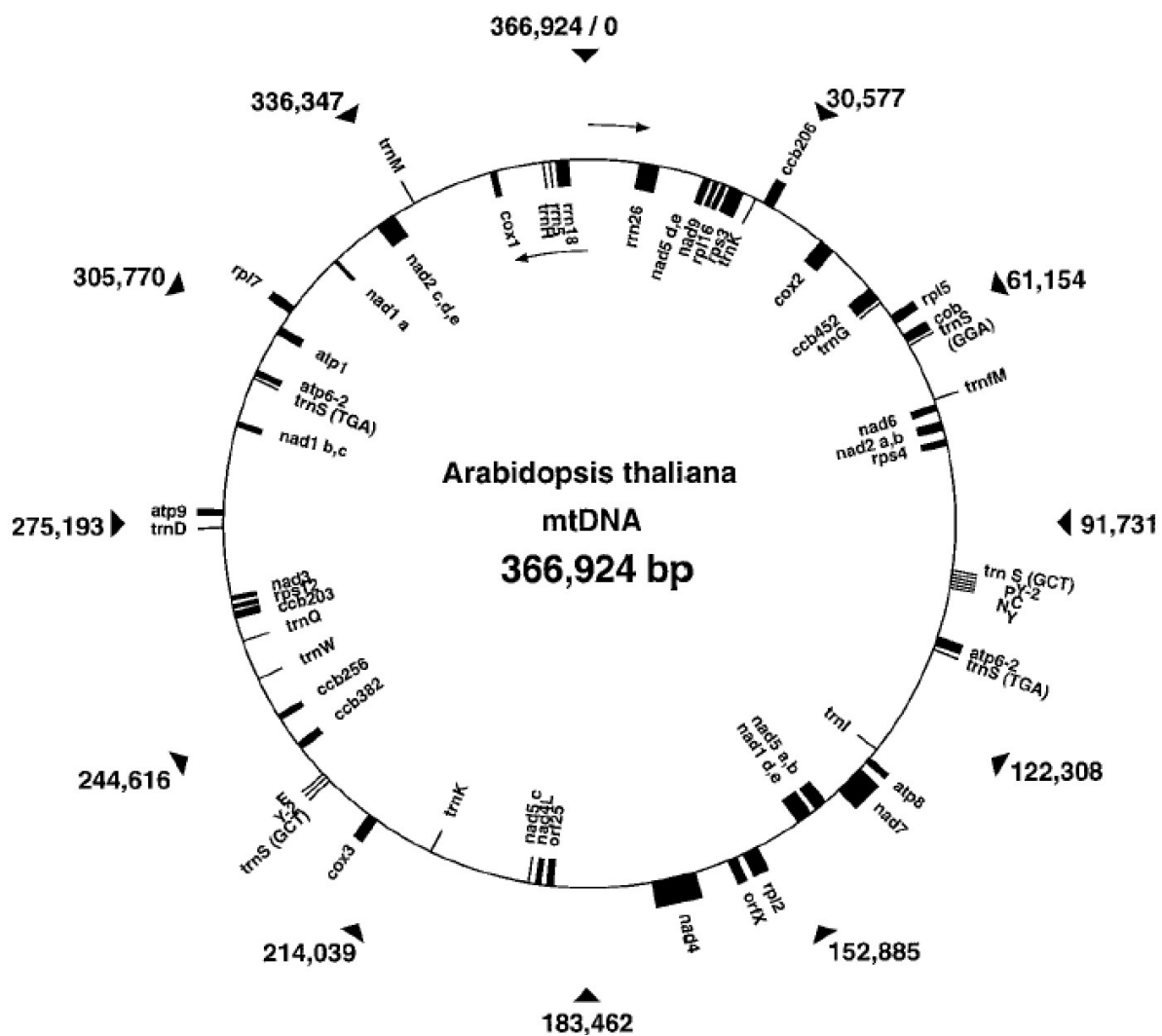


Abbildung 3: Organisation des mitochondrialen Genoms von *Arabidopsis thaliana* [aus Dombrowski et al., 1998]. Das 367 kb große Genom umfasst 57 Gene, von denen 33 für Proteine, drei für rRNAs und 20 für tRNAs kodieren [Duchene und Marechal-Drouard, 2001; Unseld et al., 1997]. Die Gene außerhalb des Ringes werden im Uhrzeigersinn transkribiert, die innerhalb des Ringes gegen den Uhrzeigersinn.

1.2.2 Organelläre RNA-Polymerasen

Aufgrund der eubakteriellen Abstammung der Chloroplasten ist die Organisation ihrer genetischen Maschinerie der von Prokaryoten sehr ähnlich. Eine Besonderheit des plastidären Transkriptionsapparates ist das Auftreten von mindestens drei RNA-Polymerasen (RNAPs) unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft: Neben einer plastidärkodierten plastidären Polymerase des Bakterientyps (PEP, *plastid encoded plastid RNA-polymerase*) treten wahrscheinlich zwei kernkodierte plastidäre RNA-Polymerasen des T3/T7-Phagentyps (NEP, *nuclear encoded plastid RNA-polymerase*) auf [Übersichten in Liere und Maliga, 2001; Liere und Börner, 2007]. Im Gegensatz zu allen anderen RNA-Polymerasen (RNAPs) aus prokaryotischen und eukaryotischen Organismen bestehen die RNAPs der T3-, T7- und SP6-Bakteriophagen aus einem einzelnen Polypeptid (*single-polypeptide-chain enzymes*). Das intensiv untersuchte Enzym des T7-Phagen erkennt spezifische Promotorsequenzen und katalysiert die Transkription bis zur Termination ohne die Unterstützung assoziierter Proteinfaktoren [Übersicht in Cheetham und Steitz, 2000]. In den Mitochondrien eukaryotischer Organismen hat mindestens eine kernkodierte T7-Phagentyp-RNA-Polymerase die ursprüngliche Bakterientyp-RNAP des endosymbiontischen Wirtes ersetzt [Übersichten in Gray und Lang, 1998; Hess und Börner, 1999; Tracy und Stern, 1995].

1.2.2.1 *RpoT*-Gene kodieren organelläre Phagentyp-RNA-Polymerasen

Der Verlust der Gene der ursprünglichen bakteriellen RNAP sowie die Abwesenheit von σ^{70} -Bakterientyp Promotorsequenzen (vgl. Kap. 1.2.3.1) im mitochondrialen Genom nahezu aller photosynthetischer Organismen impliziert den Erwerb einer neuen Transkriptionsmaschinerie, dessen Komponenten im Zellkern kodiert sind.

In *Saccharomyces cerevisiae* kodiert das Kerngen *RPO41* für eine Phagentyp-RNAP, die als katalytische Untereinheit des mitochondrialen Transkriptionsapparates fungiert [Greenleaf et al., 1986; Masters et al., 1987]. Auch im Menschen konnte die Phagentyp-RNAP h-mtRPOL als Komponente der mitochondrialen Transkription identifiziert werden [Falkenberg et al., 2002; Tiranti et al., 1997]. Weitere homologe Phagentyp-RNAP-Gene wurden in der Gymnospermen *Pinus taeda* (U. Richter, HU Berlin, persönliche Mitteilung), Grünalgen (A. Weihe, HU Berlin, persönliche Mitteilung) sowie verschiedenen Angiospermen wie *Chenopodium album* [Weihe et al., 1997], Arabidopsis [Hedtke et al., 1997; Hedtke et al., 2000], Weizen [Ikeda und Gray, 1999], Mais [Chang et al., 1999; Young et al., 1998], *Nicotiana sylvestris* [Kobayashi et al., 2002; Kobayashi et al., 2001], *Nicotiana tabacum*

[Hedtke et al., 2002], Gerste [Emanuel et al., 2004] und in dem Moos *Physcomitrella patens* [Kabeya et al., 2002; Richter et al., 2002] gefunden. Obwohl ein direkter experimenteller Nachweis zur Transkription mitochondrialer Gene durch die kodierten Genprodukte bislang aussteht, werden diese als Transkriptasen der mtGenome betrachtet.

Im Unterschied zu Pilzen und Tieren besitzen höhere Pflanzen mehr als ein *RpoT*-Gen (*RpoT*; RNA-Polymerase vom T7/T3-Typ), das für eine T7-Phagentyp RNAP kodiert [Übersichten in Hess und Börner, 1999; Liere und Börner, 2007; Shiina et al., 2005; Weihe, 2004]. Aufgrund von *in vivo*- und *in vitro*-Importstudien wird angenommen, dass die kleine Familie der drei *RpoT*-Gene in Arabidopsis für ein mitochondriales (*RpoTm*), ein plastidäres (*RpoTp*) und ein in beiden Organellen lokalisiertes Enzym (*RpoTmp*) kodiert [Hedtke et al., 1997; 2000; 2002; 1999]. Die Untersuchung der allotetraploiden Pflanze *Nicotiana tabacum* führte zur Identifizierung von sogar sechs aktiven *RpoT*-Genen [Hedtke et al., 2002]. Die Gensequenzen repräsentieren zwei orthologe Gruppen aus je drei Genen (*RpoTm*, *RpoTp*, *RpoTmp*) von jedem Elter deren Genprodukte in *in vivo*-Importversuchen die gleiche subzelluläre Lokalisierung wie die Arabidopsis-Enzyme zeigten [Hedtke et al., 2002; Kobayashi et al., 2001].

Im Gegensatz zu dikotylen Pflanzen konnten in monokotylen lediglich zwei *RpoT*-Gene identifiziert werden, von denen eines für ein mitochondriales (*RpoTm*), das andere für ein plastidäres Enzym (*RpoTp*) kodiert [Chang et al., 1999; Emanuel et al., 2004; Ikeda und Gray, 1999; Kusumi et al., 2004]. Die Lokalisierung von *RpoTp* wird durch den immunologischen Nachweis dieses Proteins in Chloroplasten aus Mais und Reis unterstützt [Chang et al., 1999; Kusumi et al., 2004].

Im Moos *Physcomitrella patens* wurden drei *RpoT*-Gene, *RpoT1*, *RpoT2* und *RpoT3*, gefunden [Kabeya et al., 2002; Richter et al., 2002, A. Weihe pers. Mitteilung]. Allen bisher untersuchten dual lokalisierten Enzymen gemeinsam sind zwei im gleichen Leserahmen liegende AUG-Startkodons in der N-terminalen Region, die als Translationsinitiationskodons genutzt werden könnten. Richter et al. [2002] beobachteten für *RpoT1* und *RpoT2* aus *Physcomitrella* bei einer Translationsinitiation am ersten Startkodon eine Lokalisierung in den Plastiden, während eine Initiation am zweiten AUG zu einem mitochondrialen Import führte. In Arabidopsis zeigten *in vivo*-Importversuche für *RpoTmp* bei Translationsinitiation am ersten Startkodon eine duale Lokalisierung, wogegen ein am zweiten AUG translatiertes Polypeptid ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert war [Hedtke et al., 2000]. Die *in vivo*-Translation am ersten AUG in Arabidopsis und *Physcomitrella* und der damit verbundene plastidäre Import wurden aufgrund von Daten von Kabeya et al. [2005; 2002] in Frage gestellt und erfordern weitere experimentelle Untersuchungen.

Es wird vermutet, dass es sich bei dem gemeinsamen Vorläufer der phagenkodierten und kernkodierten RNAPs um eine DNA-Polymerase oder Reverse Transkriptase handelt [Cermakian et al., 1997]. Die kleinen *RpoT*-Genfamilien höherer Pflanzen scheinen das Ergebnis unabhängiger Genduplikationsereignisse in einer Zeit nach der Aufspaltung von Bryophyten und der Abstammungslinie vaskulärer Pflanzen zu sein. Phylogenetische Analysen der pflanzlichen RpoTp-Enzyme zeigen, dass diese eine Schwestergruppe zur Gruppe der RpoTm und RpoTmp-Enzyme bilden [Richter et al., 2002]. Interessanterweise scheinen die mitochondrialen RNAPs (RpoTm) aus monokotylen Pflanzen näher mit den dual-lokalisierten Enzymen (RpoTmp) der dikotylen verwandt zu sein als mit RpoTm (U. Richter, HU Berlin, persönliche Mitteilung).

1.2.2.2 Plastidäre RNA-Polymerasen

Plastidärkodierte plastidäre RNA-Polymerasen (PEP)

Im Plastom nicht-parasitischer Pflanzen und Algen kodieren die Gene *rpoA*, *B*, *C1* und *C2* für die vier Untereinheiten α , β , β' und β'' einer Bakterientyp-RNA-Polymerase [Abbildung 4, Übersichten in Hess und Börner, 1999; Igloi und Kössel, 1992; Sugiura, 1995]. Die Organisation der *rpo*-Gene ist zwischen Eubakterien und Plastiden konserviert: Während *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* ein Operon bilden und gemeinsam transkribiert werden, erfolgt die Transkription des *rpoA*-Gens gemeinsam mit Genen für ribosomale Proteine [Hudson et al., 1988; Kaneko et al., 1996; Purton und Gray, 1989]. Das durch Zusammenlagerung zweier α - und jeweils einer der β -, β' - und β'' -Untereinheiten gebildete katalytisch aktive Enzym wird durch die Assoziation eines kernkodierten Sigmafaktors zum Holoenzym ergänzt und so zu einer spezifischen Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation befähigt (vgl. Kap. 1.2.4).

Die PEP wurde in löslichen transkriptionsaktiven Fraktionen aus Chloroplastenpräparationen [Hu und Bogorad, 1990; Hu et al., 1991] und als unlösliche, DNA-gebundene Komponente in den sogenannten transkriptionsaktiven Chromosomen [TAC, transcriptionally active chromosome, Little und Hallick, 1988; Pfalz et al., 2006; Suck et al., 1996] gefunden. Die aus Etioplasten isolierte lösliche Form der PEP besteht hauptsächlich aus den Kernuntereinheiten, wogegen in reifen Chloroplasten zusätzliche Proteine mit der Kernuntereinheit assoziiert sind und einen großen Komplex bilden [Baginsky et al., 1999; Link, 1996; Pfannschmidt und Link, 1994; Pfannschmidt und Link, 1997; Pfannschmidt et al., 2000]. Die Assemblierung dieses Komplexes lässt eine Regulation der PEP aufgrund variierender Lichtbedingungen und photosynthetischer Aktivität vermuten (vgl. Kap. 1.2.5).

Kernkodierte plastidäre RNA-Polymerasen (NEP)

Erste Hinweise auf die Beteiligung einer kernkodierten RNA-Polymeraseaktivität an der plastidären Transkription höherer Pflanzen lieferte die Detektion von RNA-Transkripten in ribosomendefizienten Plastiden hitzegebleichter Roggenblätter [Bünger und Feierabend, 1980] und in weißem Gewebe der Gerstenmutante *albostrians* [Siemenroth et al., 1981]. Es konnte gezeigt werden, dass die kernkodierte RNAP-Aktivität plastidäre rRNAs [Siemenroth et al., 1981] und zahlreiche andere Gene in ribosomenfreien Plastiden transkribiert [Falk et al., 1993; Han et al., 1993; Hübschmann und Börner, 1998; Zubko und Day, 1998]. Untersuchungen an dem nicht-photosynthetischen pflanzlichen Parasiten *Epifagus virginiana* [DePamphilis und Palmer, 1990; Ems et al., 1995], sowie an *rpoB*-deletierten Tabak-Plastiden [Allison et al., 1996; Hajdukiewicz et al., 1997] stützen die Annahme einer kernkodierten RNAP, da es trotz des Fehlens einer funktionellen PEP zur Transkription größerer Bereiche des Plastidengenoms kommt.

Den ersten Anhaltspunkt, dass es sich bei dieser kernkodierten transkriptionellen Aktivität um eine Phagentyp-RNA-Polymerase handeln könnte, lieferten Experimente von Lerbs-Mache et al. [1993], die in transkriptionsaktiven Präparationen aus Spinat-Chloroplasten ein 110 kD Protein identifizierten, welches *in vitro* zur Erkennung eines T7-Phagen-Promotors befähigt war.

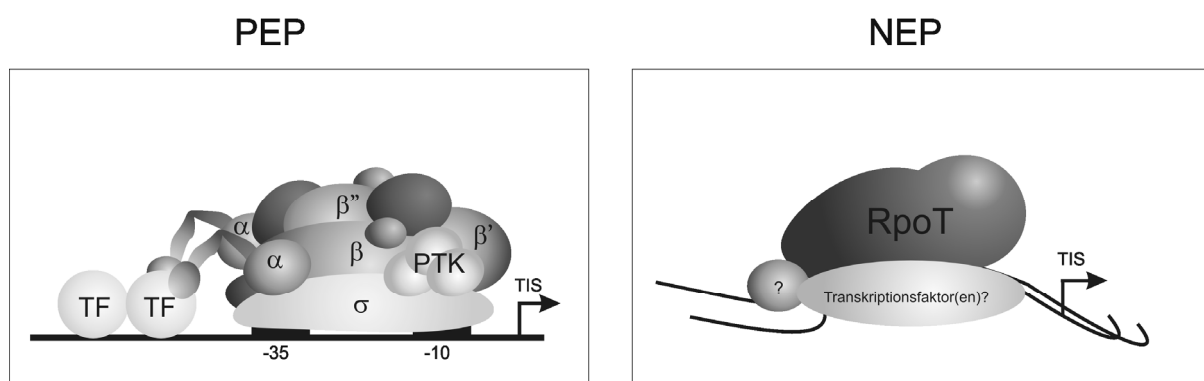


Abbildung 4: Plastidäre RNA-Polymerasen. Links: Plastidärkodierte RNA-Polymerase (PEP). In reifen Chloroplasten assoziiert die PEP mit zahlreichen kernkodierten Polypeptiden (dunkelgrau) und einer heterotrimeren Proteinkinase [PTK, plastid transcription kinase, Baginsky et al., 1999; Ogrzewalla et al., 2002]. Die Promotorbindung an den angedeuteten -10/-35-Bakterientyp-Promotor wird durch einen variablen kernkodierten Sigmafaktor vermittelt. Stromaufwärts gelegene *cis*-Elemente, die von spezifischen *trans*-Faktoren (TF) erkannt werden, könnten die Transkription stimulieren (nach Liere und Maliga, 1999). Rechts: Gezeigt ist die plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase (NEP). Die kernkodierte katalytische Untereinheit RpoT ist mit einem oder mehreren hypothetischen Transkriptionsfaktoren assoziiert. TIS: Transkriptionsinitiationsort.

Mögliche Kandidaten für eine kernkodierte Phagentyp-RNAP-Aktivität stellten die zuerst in Arabidopsis beschriebenen *RpoT*-Genprodukte dar [Hedtke et al., 1997]. Aufgrund ihrer Lokalisierung kommen RpoTmp und RpoTp als NEP-Aktivität in den Plastiden in Betracht. Hinweise auf eine tatsächliche Beteiligung von RpoTp an der plastidären Transkription lieferten Experimente von Liere et al. [2004] an transgenen Tabakpflanzen, die dieses Protein überexprimierten (vgl. Kap. 1.2.6). Interessanterweise scheint im Chloroplasten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* eine kernkodierte RNA-Polymerase des Phagentyps zu fehlen. Versuche, die PEP-vermittelte Transkription spezifisch zu hemmen, führten zu einer vollständigen Inhibierung der plastidären Transkription [Zoeger, 2001]. Auch war es nicht möglich, die für die PEP-Untereinheiten kodierenden *rpo*-Gene im Plastom von *C. reinhardtii* auszuschalten [Fischer et al., 1996; Rochaix, 1997].

1.2.3 Promotoren organellärer RNA-Polymerasen

1.2.3.1 Plastidäre Promotoren

In den Plastiden kann zwischen PEP- und NEP-Promotoren unterschieden werden, aus deren Verteilung und Nutzung eine gewisse Arbeitsteilung zwischen der kernkodierten RNAP-Aktivität und der plastidärkodierten RNA-Polymerase abgeleitet werden kann: Während Photosynthesegene und -transkriptionseinheiten PEP-Promotoren aufweisen, haben die meisten Nicht-Photosynthesegene, wie z. B. Gene für die Transkription und Translation Promotoren für beide RNA-Polymerasen. Nur wenige Haushaltsgene werden ausschließlich von der NEP transkribiert.

PEP-Promotoren

In Übereinstimmung mit der Existenz einer bakterienähnlichen RNA-Polymerase in pflanzlichen Chloroplasten weisen zahlreiche plastidäre Transkriptionseinheiten Variationen klassischer -10 -(TATAaT)/ -35 -(TTGaca)-Konsensussequenzen des *E. coli* σ^{70} -Promotortyps auf [Übersichten z. B. in Gruissem und Tonkyn, 1993; Liere und Börner, 2007; Weihe, 2004]. In allen bisher untersuchten Pflanzen und Algen konnte dieser Bakterientyp-Promotor gefunden werden, dessen funktionelle Ähnlichkeit zu bakteriellen -10 / -35 -Promotoren durch die Erkennung dieser plastidären Promotoren durch die *E. coli* RNA-Polymerase belegt wird [Boyer und Mullet, 1988; Bradley und Gatenby, 1985; Eisermann et al., 1990; Gatenby et al., 1981]. Einige Promotoren des σ^{70} -Typs besitzen zusätzliche *cis*-Elemente mit regulatorischer Signifikanz (vgl. Abbildung 5). Die detaillierte *in vitro*-Charakterisierung des *psbA*-Promotors aus

Senf führte zur Identifizierung eines TATATA-Promotorelements zwischen den -35- und -10-Hexameren, das der TATA-Box RNAP II transkribierter nukleärer Gene ähnelt [Eisermann et al., 1990; Link, 1984]. Das TATATA-Motiv und die -10-Region waren hinreichend, um *in vitro* basale Transkriptionsniveaus mit plastidären Extrakten aus Licht- und Dunkel-adaptierten Pflanzen zu gewährleisten. Dennoch war die Anwesenheit des -35-Elements essentiell für verstärkte Transkriptionsraten, die für Chloroplasten Licht-adaptierter Pflanzen charakteristisch sind [Eisermann et al., 1990; Link, 1984]. Dieses TATATA-Motiv tritt ebenfalls in der *psbA*-Promotorsequenz aus Gerste auf, anders als im Senf ist jedoch die -35-Region unerlässlich für die *in vitro*-Transkription dieses Promotors [Kim et al., 1999]. Im *psbA*-Promotor aus Weizen scheint das auch hier vorkommende TATATA-Motiv für die Promotorerkennung unwichtig zu sein. In Weizen-Keimlingen wurden zwei verschiedene Formen von PEP-Aktivitäten detektiert. Die Transkription des *psbA*-Promotors durch die in reifen Chloroplasten der Blattspitze vorkommende PEP (*tip-type* PEP) scheint lediglich auf einem ausgedehnten (*extended*) -10-Element, welches ein TGN-Motiv stromaufwärts der -10-Region beinhaltet zu beruhen [Bown et al., 1997; Satoh et al., 1999]. Dagegen erwies sich das -35-Element als essentiell für die Transkription durch die in jungen Plastiden der Blattbasis auftretende Form der PEP [*base-type* PEP, Satoh et al., 1999]. Da die *psbA*-Promotorsequenz in Senf, Weizen und Gerste hoch konserviert ist, könnte die unterschiedliche Nutzung der beschriebenen *cis*-Elemente auf einer divergenten Evolution von Transkriptionsfaktoren in diesen Organismen beruhen. Die Erkennung der -10/-35-Promotoren scheint zumindest in einigen Organismen und in bestimmten Entwicklungsstadien nur vom -10-Promotorelement abhängig zu sein. Die Interaktion der PEP mit dem -35-Element wird in diesem Fall wahrscheinlich durch eine Interaktion mit der erweiterten -10-Sequenz [Satoh et al., 1999], dem TATATA-Motiv zwischen den -10- und -35-Hexameren [Eisermann et al., 1990] oder Faktoren, die an Sequenzen stromaufwärts eines degenerierten -35-Elements binden [Allison und Maliga, 1995; Kim und Mullet, 1995; Kim et al., 1999; Thum et al., 2001], ersetzt. Der einzige bislang bekannte Promotor in höheren Pflanzen, in dem das -10-Element eine untergeordnete Rolle bei der Erkennung zu spielen scheint, ist der des rRNA-Operons, *PrrnP1* [Suzuki et al., 2003]. Stattdessen konnte ein in Monokotylen und Dikotylen konserviertes essentielles Sequenzelement stromaufwärts des -35-Elements, das so genannte RUA-Motiv (GTGGGA; *rRNA operon upstream activator*), identifiziert werden. Es wird angenommen, dass dieses Motiv eine direkte Interaktion mit der PEP oder eine Protein-Protein-Interaktion zwischen der PEP und einem RUA-bindenden Transkriptionsfaktor ermöglicht [Suzuki et al., 2003].

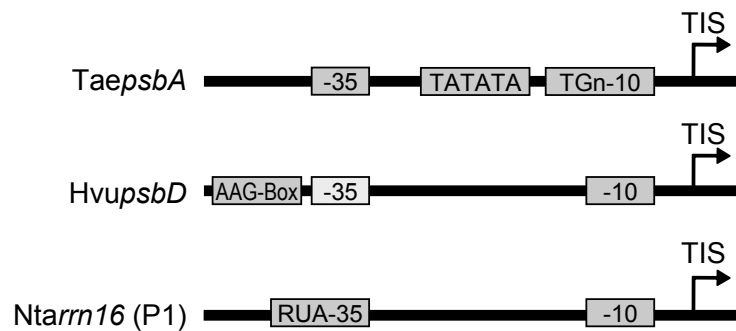


Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener PEP-Promotortypen. Gezeigt sind der *psbA*-Promotor aus Weizen (*TaepsbA*), der *psbD* Promotor aus Gerste (*HvupsbD*) und der *rrn16*-P1 Promotor aus Tabak (*Ntarrn16* (P1)) mit den konservierten -10/-35-Konsenselementen sowie den individuellen Promotorelementen (graue Boxen) wie der TATATA-Box, der ausgedehnten -10-Sequenz (TGn), der AAG-Box und dem RUA-Motiv. Das gering konservierte -35-Element des *psbD*-Promotors aus der Gerste ist in hellgrau dargestellt [nach Liere und Börner, 2007].

NEP-Promotoren

Eine Identifizierung und Charakterisierung der Transkriptionsinitiationsorte der NEP wurde durch die Entwicklung experimenteller Systeme, die eine Reduktion oder Eliminierung der transkriptionellen Aktivität der PEP erlaubten, ermöglicht. Zu diesen Systemen gehören die Plastidenribosomen-defiziente Gerstenmutante *albostrans* [Hübschmann und Börner, 1998], die *iojap* Maismutante [Silhavy und Maliga, 1998], Δ -*rpo*-Tabakpflanzen [Allison et al., 1996; Hajdukiewicz et al., 1997; Serino und Maliga, 1998] und photosynthetisch-inaktive Tabak-, Arabidopsis- und Reis-Suspensionskulturen mit verstärkter NEP-Aktivität [Kapoor et al., 1997; Miyagi et al., 1998; Silhavy und Maliga, 1998; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007; Vera et al., 1996].

Zu den Genen, die ausschließlich von der NEP transkribiert werden, zählen z. B. *accD* (kodiert für die Acetyl-CoA-Carboxylase), *clpP* (kodiert für die proteolytische Untereinheit der Clp ATP-abhängigen Protease), *rpl23* (kodiert für ein ribosomales Protein), *ycf2* (kodiert für ein Protein bislang unbekannter Funktion) und interessanterweise auch das *rpoB*-Operon, das für drei der vier Untereinheiten der PEP in höheren Pflanzen kodiert [Hajdukiewicz et al., 1997; Hübschmann und Börner, 1998; Silhavy und Maliga, 1998]. Sequenzvergleiche der stromaufwärts der Gene liegenden Bereiche zeigten, dass NEP-Promotoren sich deutlich von den oben beschriebenen PEP-Promotoren unterscheiden und eher mitochondrialen Promotoren ähneln. Aufgrund ihrer Architektur und konservierter Sequenzmotive lassen sich NEP-Promotoren einem von mindestens drei Typen zuordnen [Abbildung 6, Übersichten in Liere

und Maliga, 2001; Liere und Börner, 2007; Weihe und Börner, 1999]. NEP-Promotoren des Typs I lassen sich durch ein konserviertes YRTA-Motiv innerhalb einer AT-reichen Sequenz von etwa 10 Nukleotiden (-15/+5) unmittelbar vor der Transkriptionsinitiationsstelle (+1) charakterisieren [Kapoor und Sugiura, 1999; Liere und Maliga, 1999; Liere und Maliga, 1999; Xie und Allison, 2002]. Die systematische *in vitro*-Analyse des Typ I *rpoB*-Promotors aus Tabak zeigte, dass die Nukleotide von -14 bis +1 essentiell für die effiziente Nutzung dieses Promotors sind [Liere und Maliga, 1999]. Dennoch deuten transiente Expressionsassays mit Fusionskonstrukten aus dem 5'-flankierenden Bereich des Arabidopsis *rpoB*- und *accD*-Gens und einem Reportergen auf weitere regulatorische Elemente außerhalb der Konsensussequenz hin [Hirata et al., 2004; Inada et al., 1997].

Viele der identifizierten Typ I-Promotoren weisen 10-20 nt stromaufwärts der YRTA-Box ein zusätzliches 6-7 Nukleotide umfassendes konserviertes Sequenzmotiv (ATAN₀₋₁GAA), die sog. GAA-Box, auf und werden dem Typ Ib zugeordnet [Kapoor und Sugiura, 1999; Silhavy und Maliga, 1998]. *In vivo*- und *in vitro*-Mutationsanalysen des Typ Ib-Promotors *PatpB*-289 aus Tabak weisen der GAA-Box eine funktionale Rolle in der Promotorerkennung zu [Kapoor und Sugiura, 1999; Xie und Allison, 2002]. Promotoren des Typs I, die keine GAA-Box besitzen, werden dem Typ Ia zugewiesen.

NEP-Promotoren des Typs II unterscheiden sich in ihrer Sequenz und Architektur deutlich von Promotoren des Typs I. Die Transkriptionsinitiation wird hier durch eine konservierte

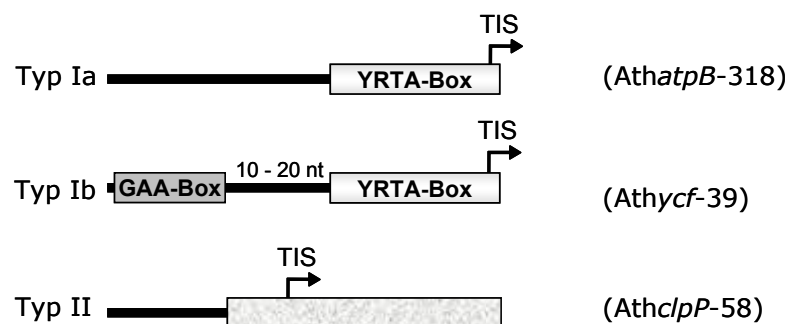


Abbildung 6: Schematische Darstellung der NEP-Promotoren vom Typ I und II. Die YRTA-Promotorkernsequenz und die GAA-Box sind angezeigt. TIS: Transkriptionsinitiationsort. Beispiele für die entsprechenden Promotortypen aus Arabidopsis in Klammern.

Nukleotidfolge zwischen den Positionen -5 und +25 vermittelt [Sriraman et al., 1998]. Das einzige bisher bekannte Beispiel für einen Typ II-Promotor ist die transkriptionsinitiiierende Sequenz des *clpP*-Gens (Abbildung 6). Die *clpP*-Promotorsequenz ist zwischen Monokotylen, Dikotylen, Nacktsamern und Lebermoosen konserviert, was auf ein frühes Auftreten des NEP-Transkriptionsapparates in der Evolution hindeutet. Dieses Motiv findet sich ebenfalls in Reis und in *Chlamydomonas*, ist hier jedoch, vermutlich aufgrund des Fehlens zusätzlich notwendiger Transkriptionsfaktoren, inaktiv [Sriraman et al., 1998].

tRNAs mit internen Promotoren

Die Mehrzahl plastidärer tRNAs wird durch die PEP an stromaufwärts liegenden Bakterientyp-Promotoren transkribiert. Einige tRNA-Gene, wie z. B. *trnS*, *trnR* und *trnT* aus Spinat [Cheng et al., 1997; Gruissem et al., 1986], *trnE* aus *Chlamydomonas* [Jahn, 1992] oder *trnS*, *trnH* und *trnR* aus dem Senf [Liere und Link, 1994; Neuhaus und Link, 1990; Nickelsen und Link, 1990] weisen jedoch weder -35/-10- noch bekannte NEP-Promotorelemente auf. Wu et al. [1997] konnten zeigen, dass die kodierende Region des *trnS*-Gens (+1/+93) basale Transkriptionsniveaus *in vitro* vermittelt, so dass angenommen wird, dass die Transkription durch Gen-interne Promotoren vermittelt wird. Die interne Sequenz des *trnS*-Gens aus Spinat [Wu et al., 1997] besitzt Sequenzelemente, welche den A- und B-Blöcken kernkodierter, von der eukaryotischen RNA-Polymerase III transkribierten tRNA-Promotoren ähneln [Galli et al., 1981; Geiduschek et al., 1995]. Hinzu kommt eine effiziente Transkription des *trnR* (ACG)-Gens aus *Pelargonium zonale* nach Injektion in Oocyten-Zellkerne aus *Xenopus laevis* [Hellmund et al., 1984], was darauf hindeutet, dass die Transkription einiger plastidärer tRNA-Gene möglicherweise durch ein RNAP III-ähnliches Enzym erfolgt. Bislang liegen keine Hinweise für das Vorkommen einer solchen RNAP in den Plastiden vor (Liere und Börner, unveröffentlichte Daten). Es ist jedoch ebenfalls vorstellbar, dass die Erkennung dieser Nicht-Konsensustyp-tRNA-Promotoren durch bestimmte, mit der NEP oder PEP assoziierter Proteinfaktoren vermittelt wird.

1.2.3.2 Mitochondriale Promotoren

Pflanzliche Mitochondrien transkribieren ihre Genome von zahlreichen Promotoren [Kühn et al., 2005; Tracy und Stern, 1995]. Die mitochondrialen Promotoren wurden durch die Identifizierung primärer Transkript 5'-Enden und den Sequenzvergleich der flankierenden, stromaufwärts liegenden Bereiche bestimmt. So konnte das in vielen plastidären NEP-Promotoren vorkommende YRTA-Motiv ebenfalls stromaufwärts mitochondrialer Gene dikotyler und monokotyler Pflanzen detektiert werden [CRTA-Motiv, Übersichten in Binder und Brennicke,

2003; Fey und Marechal-Drouard, 1999; Hess und Börner, 1999]. In Dikotylen ist das CRTA-Motiv Teil einer Nonanukleotidsequenz (**CRTAAGAGA**), welche die Transkriptions-initiationsstelle (unterstrichen) überlappt [Abbildung 7, Binder et al., 1996], wogegen die mitochondrialen Promotoren monokotyler Pflanzen in ihrer Konsensussequenz (RaaWWnn**YR-TA**nanWaa; R = A oder G; W = A oder T; K = T oder G; Y = C oder T) eine deutlich geringere Konservierung zeigen [Fey und Marechal-Drouard, 1999; Hess und Börner, 1999]. *In vitro*-Transkriptionsstudien mit mitochondrialen Extrakten bestätigten die Relevanz des YRTA-Elements und identifizierten zudem weitere stromauf- und stromabwärts dieses Motivs liegende Nukleotide mit essentieller Funktion für die Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation [Caoile und Stern, 1997; Dombrowski et al., 1999; Hanic-Joyce und Gray, 1991; Rapp et al., 1993; Rapp und Stern, 1992]. Demnach scheinen Sequenzelemente von etwa 20-25 Nukleotiden um den Transkriptionsinitiationsort wichtig für die *in vitro*-Promotorfunktion zu sein. Der *atp9*-Promotor aus der Erbse benötigt für die volle Aktivität in *in vitro*-Transkriptionsassays die Nukleotide von -14 bis + 4, der *atp1*-Promotor aus Mais die Nukleotide -12 bis + 5. Die zielgerichtete Mutagenese der Nukleotide (Positionen -3, -2 oder +1) des *atp9*-Promotors aus der Erbse und des *atp1*-Promotors aus Mais führte zu einer drastischen Reduktion der Promotoraktivität *in vitro*, obwohl sich die Identität der Nukleotide an diesen Positionen in beiden Organismen unterscheidet [Caoile und Stern, 1997; Dombrowski et al., 1999; Rapp et al., 1993; Rapp und Stern, 1992]. Dagegen zeigte der Austausch einiger hochkonservierter Nukleotide (Positionen -7, -1, +2) im Erbsen-Promotor keinen negativen Effekt auf die Transkription *in vitro*. Es scheint demnach keine strikte Korrelation zwischen der evolutionären Konservierung der Nukleotide und ihrer funktionellen Relevanz für die Promotoraktivität zu geben.

Die Mehrzahl mitochondrialer Promotoren weist unmittelbar stromaufwärts des Promotorkernmotivs ein A/T-reiches Sequenzelement auf, von dem in *in vitro*-Studien gezeigt werden konnte, dass dieses Element essentiell für die volle Aktivität verschiedener monokotyler und dikotyler Promotoren ist [Abbildung 7, Dombrowski et al., 1999; Rapp et al., 1993]. In der Erbse führte der Austausch dieser A/T-reichen Region des *atp9*-Promotors auf den komplementären Strang zu einem drastischen Verlust der Promotoraktivität, was darauf hindeutet, dass eher die Identität dieser Nukleotide als der A/T-Gehalt selbst für die *in vitro*-Funktion essentiell sind [Dombrowski et al., 1999].

Neben der beschriebenen Konsensussequenz konnten kürzlich weitere häufiger auftretende Promotormotive in *Arabidopsis* identifiziert werden [Kühn et al., 2005]. Hierzu gehört ein zweites Nonanukleotidsequenzmotiv (**CGTATATA**AA) stromaufwärts der Gene *rrn18*, *orf291*,

atp6-1, *atp9*, *atp1* und *cox2*, sowie Sequenzen mit einer relaxierten Konservierung, die die Tetranukleotidmotive ATTA bzw. RGTA drei bis vier Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsinitiationsortes oder überhaupt kein konserviertes Sequenzmotiv beinhalten [Abbildung 7, Kühn et al., 2005]. Die funktionale Relevanz dieser putativen Promotormotive wurde bislang jedoch nicht untersucht.

Ein gemeinsames Merkmal der Transkription mitochondrialer Gene monokotyler und dikotyler Pflanzen ist das Auftreten multipler Transkriptionsinitiationsorte [Kühn et al., 2005; Lupold et al., 1999; Mulligan et al., 1988]. Studien von Kühn et al. [2005] deuten auf eine nicht-gewebeabhängige Promotornutzung hin, so dass die Multiplizität der Promotoren eher eine relaxierte Promotorspezifität als eine regulatorische Rolle für die Promotorauswahl widerzuspiegeln scheint. Das Vorkommen multipler mitochondrialer Promotoren könnte die Genexpression trotz vielfältiger rekombinatorischer Genomumordnungen gewährleisten [vgl. Kap. 1.2.1, Lupold et al., 1999].

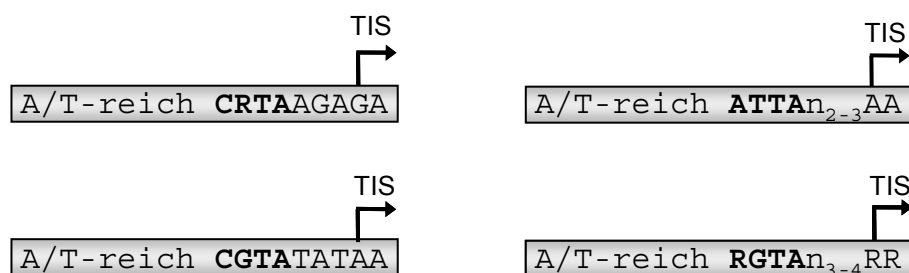


Abbildung 7: Konservierte und mehrfach auftretende mitochondriale Promotorsequenzelemente dikotyler Pflanzen. Das in vielen dikotylen Pflanzen detektierte CARTA-Motiv ist in eine die Transkriptionsinitiationsstelle (TIS) überlappende konservierte Nonanukleotidsequenz eingebettet [oben links, Übersichten in Fey und Marechal-Drouard, 1999; Hess und Börner, 1999]. Zusätzlich konnten von Kühn et al. [2005] in Arabidopsis weitere gehäuft auftretende Promotorelemente identifiziert werden (oben rechts, unten). Stromaufwärts der Promotorkernsequenzen liegende A/T-reiche Regionen sind angezeigt. Mehrfach auftretende Promotorkernsequenzen sind fett gedruckt. R = A oder G; n = beliebiges Nukleotid.

1.2.4 Transkriptionsfaktoren organellärer RNA-Polymerasen

Die Existenz einer Vielzahl verschiedener organellärer Promotormotive, die oftmals zelltyp-, entwicklungs- und umweltabhängig aktiviert werden sowie das Vorkommen verschiedener RNA-Polymerasen in einem Organell lässt eine Transkriptionsfaktor-vermittelte Genexpression in höheren Pflanzen vermuten.

1.2.4.1 Spezifitätsfaktoren der plastomkodierte eubakteriellen RNA-Polymerase (PEP)

In Algen und höheren Pflanzen sind kernkodierte Sigmafaktoren an der Transkription plastidärer Gene mit $-10/-35$ - Promotoren beteiligt. Diese Faktoren vermitteln als dissoziierbare Kofaktoren der PEP die Promotorspezifität und die Aufschmelzung der DNA um den Transkriptionsinitiationsort [Übersichten in Allison, 2000; Liere und Börner, 2007; Lysenko, 2007].

Während die biochemische Detektion einer Sigma-Aktivität in pflanzlichen Organismen bereits in den 70er und 80er Jahren gelang [Bülow und Link, 1988; Lerbs et al., 1983; Surzycki und Shellenbarger, 1976], konnten korrespondierende Gene und cDNAs erst in den letzten Jahren kloniert und charakterisiert werden. Sigmafaktoren wurden beispielsweise in Arabidopsis, Mais, Reis, Weizen, Tabak, Physcomitrella und Cyanidium als Mitglieder kleiner Genfamilien identifiziert [Übersicht in Allison, 2000].

Die N-terminalen Sequenzen zahlreicher untersuchter pflanzlicher Sigmafaktoren weisen typische plastidäre Transitsequenzen auf, die *in vivo* eine plastidäre Lokalisierung von GFP-Fusionsproteinen vermitteln [Fujiwara et al., 2000; Hara et al., 2001; Isono et al., 1997; Kanamaru et al., 1999; Lahiri und Allison, 2000; Oikawa et al., 2000; Tanaka et al., 1997]. Die funktionelle Rolle vieler pflanzlicher Sigmafaktoren wurde *in vitro* durch Rekonstitutions- und Transkriptionsexperimente mit rekombinanten Proteinen bestätigt [Beardslee et al., 2002; Bohne et al., 2006; Hakimi et al., 2000; Homann und Link, 2003; Kestermann et al., 1998; Privat et al., 2003] und konnte auch *in vivo* anhand von *knock out* und transgenen Pflanzen nachgewiesen werden [Hanaoka et al., 2003; Kanamaru et al., 2001; Yao et al., 2003].

1.2.4.2 Spezifitätsfaktoren kernkodierter Phagentyp-RNA-Polymerasen

Die Identifizierung von pflanzlichen Spezifitätsfaktoren der organellären Phagentyp-RNA-Polymerasen erwies sich bislang als schwierig. Die vielversprechendsten Hinweise auf Kofaktoren dieser Enzyme leiten sich aus der Verwandtschaft ihrer katalytischen Untereinheit zu mitochondrialen RNA-Polymerasen aus *S. cerevisiae* [Jang und Jaehning, 1991; Schinkel et al., 1987], *X. laevis* [Bogenhagen, 1996] und *H. sapiens* [Fisher und Clayton, 1988] ab. Mitochondriale Transkriptionskomplexe aus diesen Organismen weisen im Gegensatz zu Bakteriophagen-RNAPs neben der katalytischen Untereinheit mindestens eine weitere akzessorische Proteinkomponente auf. Diesem, in der Hefe als sc-mtTFB (früher Mtf1; h-mtTFB1 und h-mtTFB2 in *H. sapiens*) bezeichneten Transkriptionsfaktor, wurde ursprünglich eine Rolle in der Promotorerkennung zugeschrieben [Jang und Jaehning, 1991; Mangus et al., 1994; Shadel und Clayton, 1995], jedoch weisen neuere Untersuchungen eher auf eine Funktion bei der

Formation des offenen Promotorkomplexes oder dessen Stabilisierung während der Transkriptionsinitiation hin [Matsunaga und Jaehning, 2004]. Gestützt wird diese Annahme durch eine *in vitro* nachgewiesene intrinsische Fähigkeit der mitochondrialen RNA-Polymerase aus der Hefe [Matsunaga und Jaehning, 2004] und bedingt auch aus *H. sapiens* und Maus [Gaspari et al., 2004] zur Erkennung mitochondrialer Promotoren auf superhelikalen oder voraufgeschmolzenen DNA-Matrizen, wogegen die Transkription von Promotoren auf linearen Matrizen die Anwesenheit von mtTFB erforderte [Schinkel et al., 1987].

Trotz einer begrenzten Übereinstimmung der Aminosäuresequenz [Falkenberg et al., 2002; McCulloch et al., 2002] konnte mtTFB vor allem durch die Auflösung der dreidimensionalen Struktur der Familie der S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-abhängigen rRNA-Dimethyltransferasen zugeordnet werden [Schubot et al., 2001]. Tatsächlich ließ sich in aktuelle Analysen für h-mtTFB1 und h-mtTFB2 die Fähigkeit SAM zu binden sowie die rRNA-Dimethyltransferase KsgA in der Methylierung der 16S rRNA aus *E. coli* zu substituieren, nachweisen [Cotney und Shadel, 2006; McCulloch et al., 2002; Seidel-Rogol et al., 2003]. sc-mtTFB dagegen scheint eine Methyltransferaseaktivität zu fehlen [Cotney und Shadel, 2006]. h-mtTFB1/2-Punktmutationsanalysen der konservierten Methyltransferasedomänen deuten *in vitro* auf eine Unabhängigkeit der Methyltransferaseaktivität von der Transkriptionsfunktionsfunktion dieser Proteine hin [Cotney und Shadel, 2006; McCulloch und Shadel, 2003]. Es wird daher spekuliert, ob h-mtTFB1 und h-mtTFB2 eine duale Funktion in der mitochondrialen Genexpression zukommt.

Zusätzlich zu mtTFB tritt ein weiteres DNA-bindendes Protein, mtTFA, auf, welches der HMG (*high mobility group*)-Familie zugeordnet wird und im Menschen für die mitochondriale Transkription essentiell ist [Übersichten in Hess und Börner, 1999; Jaehning, 1993; Shadel und Clayton, 1993; Tracy und Stern, 1995]. mtTFA bindet die DNA stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle und erleichtert wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung der DNA-Doppelhelix die Zugänglichkeit der *core*-RNAP zu *cis*-regulatorischen Elementen, was zu einer Verstärkung der mitochondrialen Transkription *in vitro* führt [Falkenberg et al., 2002; Fisher und Clayton, 1985; Fisher und Clayton, 1988]. Auch ist eine Interaktion anderer transkriptionsverstärkender Faktoren mit mtTFA denkbar. Das homologe Protein aus der Hefe (sc-mtTFA) ist für die Transkription der mtDNA nicht essentiell [Xu und Clayton, 1992] und scheint eher eine Funktion in der strukturellen Organisation sowie der Aufrechterhaltung der mtDNA-Stabilität zu besitzen [Diffley und Stillman, 1991].

Bislang konnten keine mtTFA- oder mtTFB-Homologe aus pflanzlichen Organellen isoliert werden und es ist ungeklärt, ob derartige Proteine in pflanzlichen Organellen existieren. Versuche, mtTFA-ähnliche Proteine aus der Erbse mit Hilfe eines für die Präparation von mtTFA aus der Hefe und aus *H. sapiens* etablierten Protokolls zu isolieren, blieben bisher erfolglos [Däschner et al., 2001; Däschner et al., 1999; Hatzack et al., 1998].

Ein *in silico* identifiziertes Protein aus Arabidopsis (MetA, At5g66360) mit Sequenzähnlichkeit zu mtTFB zeigte in GFP-Importversuchen eine mitochondriale Lokalisierung, jedoch konnte eine mögliche Funktion dieses Proteins als Kofaktor der mitochondrialen Phagentyp-RNA-Polymerasen in *in vitro*-Transkriptionsassays nicht nachgewiesen werden [Kühn, 2005]. Ein mtTFB-ähnliches Protein konnte ebenfalls in Chloroplasten der Kälte-sensitiven Arabidopsis-Mutante Pfc1 charakterisiert werden [Tokuhisa et al., 1998]. Pfc1 (At1g01860) erwies sich als plastidäre Methyltransferase der kleinen rRNA-Untereinheit und ist zudem wichtig für die Chloroplastenentwicklung bei niedrigen Temperaturen. Ein möglicher Einfluss von Pfc1 auf die plastidäre Genexpression wurde jedoch bislang nicht untersucht.

Biochemische Ansätze führten zur Identifizierung weiterer potentieller organellärer Transkriptionsfaktoren. So konnte aus Weizenmitochondrien ein 63 kD-Protein isoliert werden [p63, Ikeda und Gray, 1999], welches *in vitro* die Transkription des *cox2*-Promotors zu stimulieren schien. Später stellte sich heraus, dass es sich bei p63 um ein PPR-Protein handelt, wodurch eher eine Funktion dieses Proteins in posttranskriptionellen Prozessen wahrscheinlich ist [Lurin et al., 2004; Small und Peeters, 2000].

In Spinat-Chloroplasten erfolgt die Transkription des *rrn*-Operons nicht wie in den meisten anderen pflanzlichen Spezies am Bakterientyp-P1-Promotor (P2 in Spinat) sondern wird an einem zwischen dem -35 und -10-Element liegenden Nukleotid initiiert, dem so genannten Pc-Promotor [Baeza et al., 1991; Iratni et al., 1997; Iratni et al., 1994]. Als potentieller Regulator der Transkription dieses Promotors kommt das DNA-Bindeprotein CDF2, welches vermutlich in zwei verschiedenen Formen (CDF2-A und CDF2-B) vorkommt, in Betracht. Während CDF2-A die Transkription durch die PEP am P1-Promotor reprimiert, stimuliert CDF2-B die Transkriptionsinitiation am Pc-Promotor durch eine bislang unbekannte kernkodierte RNA-Polymeraseaktivität [NEP-2, Bligny et al., 2000; Iratni et al., 1994].

Ein weiterer aus Spinat isolierter Faktor dem eine Funktion in der Regulation der plastidären Genexpression zukommen könnte, ist das ribosomale L4 Protein (RLP4), welches über mehrere Aufreinigungsschritte bei der Fraktionierung von Plastidenextrakten mit der katalytischen 110 kD Komponente der NEP assoziiert zu sein schien [Trifa et al., 1998].

Überraschenderweise wurde für einige Sigmafaktoren neben einer plastidären ebenfalls eine mitochondriale Lokalisierung beschrieben. Da es mit Ausnahme der Braunalge *Pylaiella littoralis* [Lang et al., 1997; Rousvoal et al., 1998] in den Mitochondrien pflanzlicher Organismen keine Hinweise auf das Vorkommen einer eubakteriellen RNA-Polymerase gibt, impliziert eine Sigmafaktor-Lokalisierung in diesem Organell eine mögliche Interaktion dieser Spezifitätsfaktoren mit einer mitochondrialen Phagentyp-RNA-Polymerase. Alternatives Spleißen im Intron 1 führt bei *AthSig5*-Transkripten zur Entstehung zweier alternativer Translationsinitiationsorte (M1 und M2). GFP-Importversuche mit dem kürzeren Peptid (Initiation an M2) zeigten eine ausschließlich plastidäre Lokalisierung, wogegen Fusionsproteine mit dem an M1 initiierten Peptid einen mitochondrialen Import hervorriefen. RNA-Analysen deuten auf eine gewebeabhängige Expression der alternativ gespleißten Transkripte hin [Yao et al., 2003]. Darüber hinaus konnte für *AthSig1::GFP*-Fusionsproteine in Tabakprotoplasten-Importversuchen eine Kollokalisierung in Plastiden und Mitochondrien gezeigt werden (H. Tandara und K. Liere, unveröffentlichte Daten). Ähnliche Ergebnisse lieferten GFP-Importstudien und immunologische Analysen des orthologen Faktors Sig2B aus Mais. Interessanterweise konnte hier zudem eine biochemische Koaufrreinigung dieses Sigmafaktors mit der mitochondrialen Phagentyp-RNA-Polymerase RpoTm nachgewiesen werden [Beardslee et al., 2002]. Experimentelle Daten, die die Aktivität dieser Sigmafaktoren mit einer Phagentyp-RNA-Polymerase in Verbindung bringen, stehen bislang jedoch aus.

1.2.5 Regulation der organellären Genexpression in Pflanzen auf Transkriptionsebene

Organelläre Proteinkomplexe setzen sich meist aus organellär- und nukleärkodierten Proteinkomponenten zusammen [vgl. Kap. 1.1, Übersicht in Martin und Herrmann, 1998]. Es wird daher angenommen, dass die Expression der in unterschiedlichen Kompartimenten kodierten Gene koordiniert ist, um stoichiometrische Mengen der einzelnen Untereinheiten zu gewährleisten. In den letzten Jahren wurden umfangreiche Studien zum Verständnis der Interaktionen zwischen dem Zellkern und den Mitochondrien bzw. Chloroplasten [Übersichten in Gray, 2003; Leon et al., 1998; Millar et al., 2004; Pesaresi et al., 2007; Pfannschmidt und Liere, 2005; Pogson et al., 2008; Poyton und McEwen, 1996; Rodermeil, 2001] dargelegt.

Während die Expression vieler Kerngene auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, ist bis zum heutigen Tag nicht geklärt in welchem Maß die Kontrolle der organellären Genexpression auf dieser Ebene erfolgt. In einer umfangreichen Studie zur koordinierten Expression des Mitochondrien- und Kerngenoms unter Zuckermangelbedingungen in *Arabidopsis* konnte weder auf transkriptioneller noch auf posttranskriptioneller oder translationeller Ebene eine

signifikante Änderung der mitochondrialen Genexpression detektiert werden [Giegé et al., 2005]. Dagegen wurde die Expression einiger kernkodierter mitochondrialer Komponenten reprimiert, wodurch diese bei der Proteinassemblierung in den Mitochondrien zu limitierenden Faktoren werden, was vermutlich zur Degradation überschüssiger mitochondrialkodierter Komponenten führt [Giegé et al., 2005].

Für eine Regulation mitochondrialer Gene auf transkriptioneller Ebene gibt es nur wenige Hinweise. Es existieren Anhaltspunkte für eine zell- oder gewebeabhängige Expression mitochondrialer Gene in Monokotylen [Li et al., 1996; Topping und Leaver, 1990]. Daten von Kühn et al. [2005] deuten dagegen nicht auf Unterschiede in der Promotornutzung in Arabidopsis Blatt- und Blütengewebe hin. *Run On*-Transkriptionsstudien mit Mais und Arabidopsis Mitochondrien zeigten, dass mitochondriale Gene vermutlich durch unterschiedliche Promotorstärken differentiell exprimiert werden [Finnegan und Brown, 1990; Giegé et al., 2000; Mulligan et al., 1991].

Bisher ist wenig über die Parameter bekannt, die die Promotorstärke *in vivo* bestimmen. *In vitro* führte der Austausch bestimmter Nukleotide in der Promotorkernregion zu einem deutlichen Verlust der Promotorstärke [Hoffmann und Binder, 2002; Rapp et al., 1993], so dass vermutlich davon ausgegangen werden kann, dass diese Regionen auch *in vivo* die Promotoraktivität bestimmen, es fehlen jedoch eindeutige Hinweise auf eine aktive Regulation der Expression individueller Gene während der Transkriptionssinitiation. Zahlreiche Studien deuten vielmehr darauf hin, dass vor allem posttranskriptionelle Prozesse in der mitochondrialen Genexpression zu unterschiedlichen *steady state* Transkript-Mengen führen [Gagliardi und Leaver, 1999; Giegé et al., 2000; Leino et al., 2005; Moneger et al., 1994; Smart et al., 1994].

Eine durch kernkodierte Faktoren kontrollierte Promotorselektivität wurde in alloplasmischen Linien in Tabak und Mais beschrieben [Edqvist und Bergman, 2002; Newton et al., 1995]. Um welche Faktoren es sich hier handelt und welche Funktion diesen in der mitochondrialen Transkription zukommt, bleibt aufzuklären.

Die Regulation der Transkription könnte neben der Ebene der Initiation ebenfalls während der Elongationsphase durch DNA-kodierte Signale erfolgen, die zum Pausieren oder zur Termination der RNAP führen. Für die T7-RNA-Polymerase sind zwei Klassen von Transkriptionsterminationssignalen bekannt, die die Freisetzung der RNA und die Dissoziation des Transkriptionskomplexes verursachen. Klasse I-Signale zeichnen sich durch die Formation einer stabilen G/C-reichen Haarnadelschleife stromaufwärts des Terminationspunktes der entstehenden RNA aus [Hartvig und Christiansen, 1996; Macdonald et al., 1994], wodurch sie intrinsischen, *Rho*-unabhängigen Terminatoren der *E. coli* RNAP ähneln. Tatsächlich konnte

in der Vergangenheit gezeigt werden, dass einige bakterielle Terminationssignale ebenfalls die T7-RNAP terminieren [Christiansen, 1988; Jeng et al., 1990; Jeng et al., 1992; Macdonald et al., 1994; Steen et al., 1986; Young, 1979]. Klasse II-Signale kodieren nicht für RNAs mit einer konsistenten Sekundärstruktur, sondern weisen eine konservierte 8 bp-Sequenz (Py-ATCTGTT im nicht-*template* Strang) auf, die zum Pausieren bzw. zur Termination der T7-RNAP 7-8 bp stromabwärts dieses Elementes führt [He et al., 1998; Lyakhov et al., 1998; Macdonald et al., 1994]. Es wird angenommen, dass es durch Klasse II-Sequenz-vermittelte Interaktionen mit der Polymerase zu konformationellen Änderungen im Enzym kommt, die schließlich zur Dissoziation führen [Lyakhov et al., 1998; Mukherjee et al., 2003; Song und Kang, 2001].

Im Menschen, Seeigel und Drosophila wurden mitochondriale Proteine identifiziert, die zur Termination der Transkription des Gens für die große rRNA-Untereinheit führen [Kruse et al., 1989; Loguercio Polosa et al., 1999; Roberti et al., 2003]. Zudem konnte für den humanen Terminationsfaktor (mTERF) und das homologe Protein aus Drosophila (DmTTF) ein stimulierender Einfluss auf die mitochondriale Transkriptionsinitiation gezeigt werden [Martin et al., 2005; Roberti et al., 2006]. Martin et al. [2005] nehmen an, dass die simultane Bindung von mTERF an die Transkriptionsterminations- und initiationsorte zu einer Schleifenbildung in der DNA führt, welche ein Recycling der Transkriptionsmaschinerie ermöglicht.

Eine große Anzahl möglicher homologer Proteine dieser Terminationsfaktoren konnte ebenfalls in Pflanzen identifiziert werden [Linder et al., 2005]. In Arabidopsis und Reis ergab die *in silico* Analyse 33 bzw. 27 Gene, die für potentielle Terminationsfaktoren mit einer vorhergesagten organellären Lokalisierung kodieren [Linder et al., 2005]. Kürzlich konnte ein entferntes homologes Protein zu mTERF in Chlamydomonas charakterisiert werden. Das als Moc1 bezeichnete Protein weist eine mitochondriale Lokalisierung auf und verursacht in Abwesenheit einen lichtsensitiven Phänotyp sowie ein abweichendes Muster mitochondrialer Transkripte [Schönfeld et al., 2004]. Die genaue Rolle dieser Proteine ist jedoch bislang unbekannt. Es ist eine Funktion in der Termination multipler Transkriptionseinheiten, aber auch eine mögliche Rolle in der Transkriptionsinitiation denkbar.

Obwohl auch in den Plastiden vor allem posttranskriptionelle Vorgänge die Genexpression zu beeinflussen scheinen [Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000; Deng und Gruissem, 1987; Monde et al., 2000; Stern et al., 1997], konnte gezeigt werden, dass sich die plastidäre Transkription in Abhängigkeit unterschiedlicher Plastidentypen, -entwicklungsstadien und Lichtbedingungen signifikant ändert [Emanuel et al., 2004; Link, 1996; Mayfield et al., 1995;

Mullet, 1993; Rapp et al., 1992; Zoschke et al., 2007]. So ist in einem frühen lichtinduzierten Plastidenentwicklungsstadium ein deutlicher Anstieg der Expression plastidärkodierter Gene zu beobachten. Darüber hinaus konnte eine Lichtabhängigkeit der plastidären Transkription in ergrünenden und reifen Blättern gezeigt werden [Baena-Gonzalez et al., 2001; Baumgartner et al., 1993; Chun et al., 2001; DuBell und Mullet, 1995; Greenberg et al., 1989; Hoffer und Christopher, 1997; Nakamura et al., 2003; Satoh et al., 1999; Schrubar et al., 1990; Shiina et al., 1998]. Es wird angenommen, dass die Regulation der plastidären Genexpression auf transkriptioneller Ebene vor allem durch die Interaktion diffentiell exprimierter kernkodierter Spezifitätsfaktoren (vgl. Kap. 1.2.4) mit den plastidären RNAPs erfolgt [Übersicht in Liere und Börner, 2007]. In Übereinstimmung mit einer prominenten Rolle der PEP in photosynthetisch-aktiven Plastiden werden die viele Sigmafaktoren lichtabhängig exprimiert [Übersicht in Liere und Börner, 2007]. Darüber hinaus konnte eine differentielle Expression dieser Spezifitätsfaktoren in verschiedenen Plastidenentwicklungsstadien gezeigt werden [Übersicht in Liere und Börner, 2007]. Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Regulation der transkriptionellen Aktivität der PEP wird der redoxabhängigen Phosphorylierung des Enzyms sowie der Sigmafaktoren durch eine plastidäre CK2-Typ Kinase zugeschrieben [Baginsky et al., 1997; Christopher et al., 1997; Ogrzewalla et al., 2002; Tiller und Link, 1993].

Die Wahrnehmung unterschiedlicher Lichtqualitäten wird durch verschiedene Klassen pflanzlicher Photorezeptoren vermittelt. Es wird angenommen, dass diese als Cryptochrome und Phytochrom A bezeichneten Proteine im Kern die Expression bestimmter Spezifitätsfaktoren hervorrufen, welche dann in den Plastiden zu einer Aktivierung von Photosynthesegenen führen [Chun et al., 2001; Thum et al., 2001]. Ein solcher durch mehrere Stressfaktoren und Blaulicht aktivierter Spezifitätsfaktor ist AthSig5, welcher die Expression des *psbD-psbC*-Operons durch Bindung an den BLRP (*blue light-responsive promoter*) reguliert [Mochizuki et al., 2004; Nagashima et al., 2004; Tsunoyama et al., 2004; Tsunoyama et al., 2002].

Eine regulatorische Rolle in der plastidären Gentranskription wurde kürzlich der plastidären tRNA^{Glu} zugeschrieben [Hanaoka et al., 2005]. Die Transkription dieser vom *trnE*-Gen kodierten tRNA erfolgt durch die PEP, welche mit dem früh in der Chloroplastenentwicklung exprimierten Sigmafaktor Sig2 assoziiert ist. Elektrophoretische Mobilitätsassays deuten auf eine spezifische Bindung der tRNA^{Glu} an rekombinantes RpoTp-Enzym hin [Hanaoka et al., 2005]. Die Autoren zeigten darüber hinaus in *in vitro*-Transkriptionsexperimenten mit proplastidären Extrakten aus *Arabidopsis* eine Inhibition der wahrscheinlich von der NEP katalysierten Transkription des plastidären *accD*-Promotors bei Zugabe von tRNA^{Glu}. Hanao-

ka et al. postulieren daher einen durch die tRNA^{Glu} vermittelten „switch“ von der kernkodierten Phagentyp-RNAP zur plastidärkodierten Bakterientyp-RNAP während der Chloroplasten- und Blattentwicklung.

Ein weiterer, übergeordneter Mechanismus der Regulation der organellären Genexpression auf Transkriptionsebene ist die Topologie der DNA. Bakterielle DNA liegt in einem negativ-superhelikalen Zustand vor, der die DNA-Rekombination, Replikation, Transkription und Transposition begünstigt. Exogene Stimuli, wie osmotischer Stress oder Temperaturveränderungen beeinflussen die Superhelikalität der DNA [Übersicht in Rui und Tse-Dinh, 2003] wodurch impliziert wird, dass durch den Grad der DNA-Windung umweltbedingte Änderungen an die Transkriptionsmaschinerie weitergegeben werden.

In Pflanzen existieren bislang nur wenige Daten über den Einfluss der DNA-Konformation auf die organelläre Genexpression. Es wird angenommen, dass die transkriptionelle Aktivität des Nukleoids während der Chloroplastenentwicklung aufgrund von morphologischen und molekularen Unterschieden variiert. In Mais konnte gezeigt werden, dass Änderungen in der DNA-Topologie *in vitro* die plastidäre Transkription beeinflussen [Stirdivant et al., 1985]. Darüber hinaus scheinen in *Chlamydomonas* Änderungen der Superhelikalität des plastidären Nukleoids mit circadianen Änderungen der Transkriptionsraten zu korrelieren [Salvador et al., 1998]. Ein kürzlich in der Erbse identifiziertes abundantes 70-kD Protein, eine Sulfitreduktase (SiR), könnte in die Regulation der transkriptionellen Aktivität des Plastoms involviert sein [Sato et al., 2001; Sato et al., 2003]. Die Zugabe von rekombinanter SiR aus Mais führte *in vitro* zu einer reversiblen Kompaktierung isolierter Plastiden-Nukleotide, wodurch die transkriptionelle Aktivität des Nukleoids reprimiert wurde [Sekine et al., 2002]. Ein weiteres Protein mit einer cpDNA-kompaktierenden und replikationshemmenden Wirkung, das eine ähnliche Größe wie die SiR aufweist, wurde zudem in der Sojabohne gefunden [Cannon et al., 1999].

Auch die Methylierung organellärer DNA wurde beschrieben, scheint jedoch in der Regulation der Genexpression eher eine untergeordnete Rolle zu spielen [Gauly und Kössel, 1989; Hess et al., 1993; Isono et al., 1997; Kobayashi et al., 1990; Ngernprasirtsiri und Akazawa, 1990; Ngernprasirtsiri et al., 1989; Šimková, 1998].

1.2.6 Rollen der Phagentyp-RNA-Polymerasen in der organellären Gentranskription

Die Annahme, dass organelläre Gene von mehreren verschiedenen RNA-Polymerasen transkribiert werden, wirft die Frage auf, welche Funktion diesen Enzymen in der Genexpression zukommt.

In den Plastiden wurde die entwicklungsabhängige Expression von Haushaltsgenen in Proplastiden und Photosynthesegenen in reifen Chloroplasten zunächst einer sequentiellen Transkription durch die NEP bzw. PEP zugeschrieben [DuBell und Mullet, 1995; Mullet, 1993]. Neuere Daten deuten jedoch auf komplexere Regulationsmechanismen hin. Das Vorliegen von plastidären Genen mit ausschließlich NEP-Promotoren, wie z. B. das *clpP*- oder das *rpoB*-Gen, deren Expression zu allen Zeitpunkten der Plastidenentwicklung essentiell ist (vgl. Kap. 1.2.3.1), weist auf eine NEP-Aktivität in allen Plastidentypen hin. Umgekehrt erfordert beispielsweise die ausschließlich PEP-abhängige Transkription des wichtigen *rrn*-Operons in Monokotyledonen die Anwesenheit dieser Polymerase auch in sehr frühen Plastidenentwicklungsstadien [Silhavy und Maliga, 1998; Silhavy und Maliga, 1998]. Es ist daher eher von einer parallelen Funktion beider Transkriptionssysteme auszugehen.

Was macht jedoch das Vorliegen zweier Phagentyp-RNA-Polymerasen in den Mitochondrien und Plastiden dikotyler Pflanzen erforderlich? Unterschiedliche Funktionen von RpoTp und RpoTmp in den Plastiden bzw. RpoTm und RpoTmp in den Mitochondrien konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Die vielversprechendsten Ansätze zur Aufklärung der Rollen dieser Enzyme in der organellären Gentranskription kommen derzeit aus der Analyse von *RpoT*-Deletions- und Überexpressionsmutanten. Eine Studie von Liere et al. [2004] an transgenen Tabakpflanzen, welche die RpoTp-cDNA überexprimieren, zeigte eine verstärkte Transkription bestimmter Typ I NEP-Promotoren, was eine RpoTp-abhängige Expression dieser Gene vermuten lässt. Eine veränderte Expression NEP-abhängiger Gene konnte ebenfalls bei einer Analyse der Arabidopsis SCABRA3-Mutante präsentiert werden, die eine T-DNA-Insertion im RpoTp-Gen trägt [Hricová et al., 2006]. Darüber hinaus zeigte die Mutante eine große Anzahl verändert exprimierter Kerngene sowie schwerwiegende Defekte in der Chloroplastenentwicklung und Blattmorphogenese.

Weitere Hinweise auf die Funktion der RpoTs lieferten Analysen entwicklungs- und gewebeabhängiger Expressionsmuster der Enzyme in Arabidopsis [Emanuel et al., 2006]. Emanuel et al. zeigten durch Detektion von *steady state*-Transkriptmengen eine überlappende Expression von RpoTm und RpoTmp in unterschiedlichen Geweben und in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Während RpoTm und RpoTmp-Transkripte vor allem in meristematischen und mitochondrienreichen Geweben wie der Wurzelspitze exprimiert wurden, zeigten RpoTp-

Transkripte die größte Akkumulation in grünen Geweben. Die Autoren nehmen an, dass RpoTm und RpoTmp in den Mitochondrien verschiedene Promotoren erkennen. In den Plastiden grüner Gewebe scheint die Transkription vornehmlich durch RpoTp zu erfolgen, wogegen in nicht-grünen Geweben RpoTmp diese Funktion übernehmen könnte.

Gegen eine Erkennung unterschiedlicher mitochondrialer Promotoren durch RpoTm und RpoTmp sprechen Studien von Baba et al. [2004]. In den untersuchten transgenen Arabidopsislينين mit einer T-DNA-Insertion im RpoTmp-Gen, konnte keine signifikante Veränderung in der mitochondrialen Transkriptakkumulation beobachtet werden. Dagegen zeigten die Mutanten Abweichungen in der Abundanz plastidärer Transkripte und eine verzögerte Ergrünung im Vergleich zum Wildtyp. Baba et al. [2004] gehen von einer Hauptrolle von RpoTmp in der Transkription plastidärer Gene in der frühen Keimlingsentwicklung aus. RpoTm und RpoTp wird eine Funktion in späteren Entwicklungsstadien zugeschrieben. Hricová et al. [2006] dagegen nehmen eine teilweise redundante Funktion der beiden plastidären RpoT-Polymerasen in der Plastidenentwicklung an, da eine RpoTp/RpoTmp-Doppelmutation zur Letalität in einem sehr frühen Keimlingsstadium der Arabidopsismutanten führte. *Primer extension*-Analysen plastidärer Transkripte aus RpoTmp- und RpoTp-T-DNA-Insertionslinien aus Arabidopsis durch Courtois et al. [2007] deuten auf eine RpoTp-abhängige Expression der NEP-abhängigen Gene *accD*, *rpoB* und *clpP*, wogegen RpoTmp möglicherweise für die Transkription des *rrn16*-Pc-Promotors verantwortlich ist. Anders als Baba et al. [2004, s. o.] gehen die Autoren davon aus, dass es sich bei RpoTp um die prinzipielle RNAP in den Plastiden handelt und RpoTmp die spezifische Transkription des *rrn*-Operons übernimmt. Trotz der zumeist indirekten Nachweise und zum Teil widersprüchlichen Beobachtungen zur Funktion der RpoTs in den Plastiden und Mitochondrien kann diesen Polymerasen wohl klar eine Rolle in der organellären Transkription zugeschrieben werden. Die Bestimmung dezidierter Funktionen bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen.

Im Menschen und vermutlich auch in der Hefe erfüllt die mitochondriale RNA-Polymerase neben der Gentranskription zudem die Funktion als Primase in der Replikation der mtDNA [Shadel und Clayton, 1997; Tracy und Stern, 1995]. Ob den pflanzlichen RpoTs möglicherweise eine ähnliche Rolle zukommt, bleibt ebenfalls aufzuklären.

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Trotz der generellen Annahme, dass es sich bei den kernkodierten *RpoT*-Genprodukten um katalytische Komponenten der organellären Genexpression handelt, ist die genaue Rolle der drei in *Arabidopsis thaliana* identifizierten Phagentyp-RNA-Polymerasen weitestgehend unbekannt. Zwar konnte durch *in vivo*-Importstudien eine Lokalisierung von RpoTm in den Mitochondrien, RpoTp in den Plastiden und RpoTmp in beiden Organellen gezeigt werden, doch fehlt bislang der direkte Nachweis einer tatsächlichen Beteiligung dieser Enzyme an der organellären Genexpression. Es wird zudem angenommen, dass RpoT-spezifische Kofaktoren die Transkription stimulieren oder eine Promotorerkennung erst ermöglichen. Versuche, entsprechende Faktoren aus höheren Pflanzen zu identifizieren, waren bislang jedoch erfolglos.

Zur Charakterisierung der RpoT-RNA-Polymerasen aus *Arabidopsis* sollte daher mit heterolog exprimierten Enzymen und Organellenpromotoren ein *in vitro*-Transkriptionssystem entwickelt werden. Eine Voraussetzung hierfür war die kürzlich erfolgte Kartierung zahlreicher Transkriptionsinitiationsorte im mitochondrialen und plastidären Genom von *Arabidopsis thaliana*. Das *in vitro*-System sollte eine vergleichende Analyse der transkriptionellen Eigenschaften der Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTm, RpoTmp und RpoTp und gleichzeitig eine Bestätigung *in vivo* detektierter Transkriptionsinitiationsorte ermöglichen. Hierbei sollten den RpoTs durch eventuelle Unterschiede in der Promotornutzung spezifische Funktionen in der organellären Genexpression zugeordnet werden.

Über die Mechanismen, welche die Transkriptionsraten der RpoTs *in vivo* regulieren, ist wenig bekannt. Einige Hinweise deuten auf eine Regulation durch verschiedene Promotorstärken und übergeordnete Faktoren, wie die DNA-Konformation hin. Es sollten daher *cis*-regulatorische Sequenzelemente, die möglicherweise die Promotorstärke *in vivo* beeinflussen durch Mutageneseexperimente charakterisiert, sowie der Einfluss der DNA-Konformation untersucht werden.

Darüber hinaus sollten mit Hilfe des *in vitro*-Systems weitere Komponenten der organellären Transkriptionsapparate wie z. B. potentielle Regulations- und Transkriptionsfaktoren der RpoT-Enzyme auf eine Funktion überprüft werden. Als mögliche Faktoren sollten z. B. *in silico* identifizierte Proteine, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu essentiellen Transkriptionsfaktoren der mitochondrialen RNAPs, aus der Hefe und dem Menschen, als aussichtsreiche Kandidaten angesehen wurden, analysiert werden. Es handelt sich hierbei um pflanzliche Homologe der bifunktionalen mtTFB-Proteine, die zur Klasse der RNA-Dimethyltransferasen gehören.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Sigma, MP Bio-medicals, Serva oder Becton Dickinson bezogen, Radiochemikalien von der Firma Amersham Buchler. Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden in Reinstwasser (USF Purelab Plus System) angesetzt und gegebenenfalls zur Sterilisierung bei 212°C und 55 kPa für 20 min autoklaviert, bzw. bei Hitzeempfindlichkeit der Bestandteile, steril filtriert. Alle weiteren Materialien sowie Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen sind an entsprechender Stelle in den nachfolgenden Abschnitten angegeben.

2.1.1 Bakterienstämme

Die für die Transformation von Ligationsprodukten (Kap. 2.2.3.6) und Expression rekombinanter Proteine (Kap. 2.2.5.1) verwendeten Bakterienstämme sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 1: Eingesetzte *E. coli*-Stämme und deren Verwendung. Genotypen nach Angaben der Herstellerfirmen.

Name	Genotyp	Verwendung	Anbieter
Top 10	F^- , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara, leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL(strr)</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Transformation von Ligationsprodukten, Retransformation	Invitrogen
BL21 Codon Plus RIL	$F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r gal endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]$	Expression rekombinanter Proteine	Stratagene
BL21 PRO	<i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , F^- , Tet^r , $P_{lacI}^{9/lacI}$, Sp^r	Expression rekombinanter Proteine	Clontech

2.1.2 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana (Ökotyp Columbia)

Nicotiana tabacum L. cv. Petit Havana

Nicotiana tabacum L. cv. Petit Havana; plastidäre Mutanten SR7 und SR8: Integriertes *nptII*-Gen unter Kontrolle des mitochondrialen *PatpA*-Promotors aus *Oenothera berteriana* [Bohne et al., 2007].

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma oder Eurogentec bezogen. Die Reinigung von Oligonukleotiden, die als Starteroligonukleotide in die PCR (Kap. 2.2.3.3) eingesetzt wurden, erfolgte durch Entsalzung, die von Oligonukleotiden, die zur direkten Insertion kurzer Sequenzen in Plasmide eingesetzt wurden, durch HPLC. Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms *oligo calculator* (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>) berechnet. Die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

2.1.4 Computerprogramme

Zur Planung von Klonierungen, Erstellung von Plasmidkarten und zur Ermittlung geeigneter Starteroligonukleotide für die PCR wurden die Programme *Gene Construction Kit* v 2.5.13 der Firma TEXTCO und *Primer 3* v 0.4.0 [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, Rozen und Skaletsky, 2000] verwendet. Die Detektion und Analyse radioaktiver Signale erfolgte mit Hilfe des Programms *Quantity One* v 4.6.2 (Bio-Rad). Zur Datenbankrecherche und Homologiesuche in öffentlichen Sequenzdatenbanken am National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurde der BLAST-Algorithmus, [Blast v 2.2.16, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Altschul et al., 1997; Altschul et al., 1990] eingesetzt. Physikochemische Parameter von Proteinen wurden mit Hilfe des Programms ProtParam [<http://expasy.org/tools/protparam.html>, Altschul et al., 1997] abgeleitet. Multiple Sequenzvergleiche erfolgten unter Verwendung des Programms *Multalin* v 5.4.1 [<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>, Corpet, 1988]. Die Text- und Bildbearbeitung erfolgte mit gängigen Programmen der Firma Microsoft.

2.1.5 Anbieter

Applied Biosystems	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Ambion	Ambion Inc., Austin, USA
Amersham	Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Amersham Biosciences	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham Pharmacia Biotech	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Becton Dickinson	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biometra	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
BioRad	Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Biozym	Biozym Diagnostik GmbH, Hameln, Deutschland
Calbiochem	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Clontech	Clontech Laboratories, Heidelberg, Deutschland
DuPont	DuPont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Epicentre	Epicentre Biotechnologies, Madison, USA
Eurogentec	Eurogentec, Seraing, Belgien
Fermentas	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Labnet	Labnet International Inc., Edison, USA
Macherey-Nagel	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Millipore	Millipore Corp., Bedford, USA
MP Biomedicals	MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland
Pierce	Pierce, Rockford, USA
PeqLab	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Promega	Promega Corp., Madison, USA
QIAGEN	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Retsch	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Roth	C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Sartorius	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Serva	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Sigma	Sigma Chemical Company, St. Luis, USA
Stratagene	Stratagene, La Jolla, CA, USA
TaKaRa	TaKaRa Bio Europe S.A.S., Saint-germain-en-laye, Frankreich
TosoHaas	TosoHaas GmbH, Stuttgart, Deutschland
USF	USF, Seral Reinstwassersysteme GmbH, Deutschland
Whatman	Whatman Paper, Maidstone, England

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* erfolgte wie beschrieben in [Emanuel et al., 2006], die von *Nicotiana tabacum* wie in [Bohne et al., 2007]. Zur Aussaat von Arabidopsis-Samen auf zuckerhaltigen SEA-Platten wurden die Samen zuvor für 2 min mit 70% Ethanol, für 15 min mit 5%iger Natriumhypochlorid /1% SDS-Lösung und 5 x für 1 min mit Reinstwasser gewaschen.

2.2.2 Anzucht von *Escherichia coli*-Kulturen

Die Vervielfältigung rekombinanter Plasmide erfolgte in *E. coli* Top10 (Invitrogen). Die Zellen wurden der plasmidkodierte Resistenz entsprechend in LB-(Agar)-Selektionsmedium unter Standardbedingungen angezogen [Sambrook und Russell, 2001]. Die Kultivierung von *E. coli* zur Expression rekombinanter Proteine erfolgte wie beschrieben unter Kap. 2.2.5.1.2.

2.2.3 Nukleinsäuren

2.2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.3.1.1 *Isolierung von Gesamt-DNA aus Arabidopsis*

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus Arabidopsis Blattmaterial erfolgte mit Hilfe der CTAB-Methode [Murray und Thompson, 1980].

2.2.3.1.2 *Plasmidisolierung aus E. coli*

Kleinpräparationen von Plasmid-DNA wurden durch alkalische Lyse der Bakterien gemäß dem bei Sambrook und Russell [2001] beschriebenen Protokoll durchgeführt. Großpräparationen erfolgten unter Zuhilfenahme des *Plasmid Midi Kits* (QIAGEN) nach Anweisung des Herstellers.

2.2.3.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA und Chloroplasten-RNA aus *Arabidopsis* und Tabak

Gesamt-RNA aus *Arabidopsis* und Tabak Blattmaterial wurde mittels Trizol (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und in Reinstwasser resuspendiert. Anschließend wurde die RNA DNaseI (Roche) behandelt und mit Hilfe des *NucleoSpin RNAII Kits* (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Zur Präparation von Chloroplasten-RNA aus Tabak wurden zunächst Chloroplasten isoliert (Kap. 2.2.4). Aus den erhaltenen intakten Chloroplasten wurde die RNA mit Trizol (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Analyse präparierter RNAs erfolgte wie beschrieben unter Kap. 2.2.3.2.2.

2.2.3.1.4 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte über die Messung der Absorption bei 260 nm mittels eines UV-Spektrophotometers (*GeneQuant II* Photometer, Amersham Biosciences). Hierbei entspricht einer Absorption von $OD_{260} = 1$ bei einer Schichtdicke von 1 cm etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA, wobei der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm als Maß für die Reinheit der Lösung diene.

2.2.3.2 Elektrophorese von Nukleinsäuren

2.2.3.2.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur analytischen und präparativen Auftrennung wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 0,005% (w/v) Bromphenolblau; 0,005% (w/v) Xylencyanol) versetzt und auf 0,8-1,5%igen Agarosegelen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA) aufgetrennt. Zur effektiven Analyse von 5'-RACE-Produkten wurden Gele mit 1% Agarose (Biozym) und 2% Nusieve Agarose (Biozym) verwendet. Parallel zu den Proben wurde ein 100 bp- bzw. 1 kb-DNA-Molekulargewichtsmarker (Promega) aufgetragen. Die DNA wurde bei einer Spannung von 5-10 V/cm in einer horizontalen Elektrophoresekammer (*PerfectBlue Gelsystem Mini S* oder *Mini M*, Peqlab) in 1 x TAE-Laufpuffer aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch UV-Transillumination (*Gel Doc XR System*, BioRad) visualisiert. DNA Moleküle aus präparativen Agarosegelen wurden ausgeschnitten und mittels *QIAquick spin columns* (QIAGEN) gereinigt.

2.2.3.2.2 Agarosegelelektrophorese von RNA

Zur Qualitätskontrolle wurde jeweils 1 µg präparierte RNA (Kap. 2.2.3.1.3) auf 1%igen Agarosegelen analysiert. Hierzu wurde 1% (w/v) Agarose (Biozym) in 1 x MEN geschmolzen und nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C 1/40 des endgültigen Gelvolumens Formaldehyd zugegeben. Die RNAs wurden mit 2 x RNA Ladepuffer (50% (v/v) Formamid; 17,5% (v/v) Formaldehyd; 20% Glycerin, 1,25 mM EDTA pH 8,0; 1,27 mM Ethidiumbromid; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 0,2% (w/v) Xylencyanol; in 1 x MEN) versetzt und vor der Beladung des Gels für 5 min bei 65°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in 1 x MEN-Laufpuffer (20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) bei 8 V/cm in einer horizontalen Elektrophoresekammer (*PerfectBlue Gelsystem Mini S*, Peqlab) durchgeführt. Aufgetrennte

RNA-Moleküle wurden durch UV-Transillumination (*Gel Doc XR System*, BioRad) visualisiert.

2.2.3.2.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von RNA

Die Auftrennung *in vitro* synthetisierter RNA-Transkripte (Kap. 2.2.7.3) erfolgte in 4%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen mit Hilfe einer Sequenzgel-Elektrophoresekammer (*Model S2 Sequenzgel Elektrophorese Apparatur*, Biometra GmbH). Zur Generierung eines radioaktiv-markierten RNA-Längenstandards wurde das *RNA Century Marker Template Plus* (Ambion) sowie der *MAXIscript Kit* der Firma Ambion nach Angaben der Hersteller verwendet. Der Marker wurde parallel zu den RNA-Proben aufgetragen. Nach einem 20-minütigen Gel-Vorlauf wurden die in Formamidladepuffer gelösten, denaturierten Proben in 0,6 x TBE-Laufpuffer bei 55 W für ca. zwei Stunden aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend auf Whatman 3MM Papier transferiert, auf einem *Model 583 Geltrackner* (BioRad) getrocknet und der Autoradiographie in einem Phosphorimager (*Molecular Imager FX*, BioRad) unterzogen.

Die Analyse von *in vitro*-Transkriptionsprodukten von aufgeschmolzenen Promotoren (Kap. 2.2.7.1.2) erfolgte in 20%igen Polyacrylamidgelen, sonst wie oben beschrieben.

Die Analyse *in vitro*-synthetisierter tRNAs (Kap. 2.2.7.2) erfolgte in 10%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen unter Verwendung des *Mighty Small II Vertical*-Elektrophoresesystems (Hoefer) bei einer Spannung von 150 V. Die aufgetrennten RNAs wurden mit Ethidiumbromid nachgefärbt und durch UV-Transillumination (*Gel Doc XR System*, BioRad) visualisiert.

1 x TBE:	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
Gelzusammensetzung:	7 M Harnstoff; 4-20% Acrylamid (Gel 40, Roth) in 1,2 x TBE
2 x Formamidladepuffer	98% (v/v) deionisiertes Formamid; 2 mM EDTA; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 0,02% (w/v) Xylencyanol

2.2.3.2.4 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von DNA

Zur Kontrolle der Effizienz des unter Kap. 2.2.7.1.2 beschriebenen *primer annealings* wurde 1 µg der hybridisierten Oligonukleotide parallel zu einzelsträngigen Oligonukleotiden auf nativen 15%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung des *Mighty Small II Vertical*-Elektrophoresesystems (Hoefer) für ca. 2 h bei einer Spannung von 150-200 V in 0,6 x TBE. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid nachgefärbt und durch UV-Transillumination (*Gel Doc XR System*, BioRad) visualisiert.

RNA/Protein-Komplexe (Kap. 2.2.6.2) wurden durch native PAGE in 5%igen Gelen bei 4°C in einer *Protean II xi*-Elektrophoreseeinheit (BioRad) in 0,5 x TBE (Kap. 2.2.3.2.4) aufgetrennt. Vor der Beladung des Gels erfolgte ein Vorlauf bei 200 V für 1-1,5 h. Die Auftrennung der Komplexe wurde für 4-6 h bei 15 mA/Gel durchgeführt. Das Trocknen der Gele sowie die Detektion radioaktiver Signale erfolgten wie beschrieben unter Kap. 2.2.3.2.3.

1 x TBE:	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
Gelzusammensetzung:	5 oder 15% Acrylamid (Gel 40, Roth) in 0,5 x TBE
2 x Ladepuffer:	0,6 M Tris/HCl pH 6,8; 50% (v/v) Glycerol; 0,4% (w/v) Bromphenolblau

2.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer Sequenzen aus genomischer oder Plasmid-DNA wurde *Taq*-DNA-Polymerase (QIAGEN) im mitgelieferten Puffer sowie 200 μ M dNTPs und jeweils 10 pmol Starteroligonukleotide in einem 50 μ l Reaktionsansatz nach Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Die angebotene DNA-Menge variierte zwischen 1 ng (Plasmid-DNA) und 100 ng (genomische DNA). Nach einem zweiminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C wurden 30-40 Zyklen durchgeführt, wobei die Denaturierung bei 94°C (30 sec), die Bindung bei 50-65°C (30 sec) und die Synthese bei 72°C (1 min /kb) erfolgte. Um das Vorhandensein evtl. unvollständiger Amplifikationsprodukte zu minimieren, schloss sich ein weiterer Elongationsschritt bei 72°C für 10 min an. Die PCR wurde in einem *Peltier Thermal Cycler PTC-200* (Biozym) durchgeführt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.2.3.2.1).

2.2.3.4 cDNA-Synthese und RT-PCR

Die cDNA-Synthese aus 2,5-5 μ g DNaseI-verdauter Gesamt-RNA (Kap. 2.2.3.1.3) erfolgte unter Verwendung des *Omniscript RT kits* (QIAGEN) und 250 nmol Zufalls-Hexamer-Oligonukleotiden (Fermentas) nach Anweisung des Herstellers für 2 h bei 42°C.

Für die Amplifikation proteinkodierender Sequenzen aus cDNA wurde *Pfu* DNA-Polymerase (Promega) verwendet. Die 50 μ l-PCR-Ansätze enthielten 2,5 U DNA-Polymerase, jeweils 10 pmol des Vorwärts- und Revers-Oligonukleotids, 10 μ mol dNTPs und 0,5 μ l der cDNA-Synthesereaktion im entsprechenden Puffer. Die Amplifizierungsbedingungen waren wie beschrieben unter Kap. 2.2.3.3 mit einer Syntheszeit (72°C) von 2 min pro 1 kb Amplikonlänge. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.2.3.2.1).

2.2.3.5 Klonierung

Standardmethoden zur DNA-Manipulation wie Restriktionsspaltungen, Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels Alkalischer Phosphatase und Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase erfolgten nach den bei Sambrook und Russell [2001] beschriebenen Methoden. Restriktasen, Alkalische Phosphatase und T4 DNA-Ligase wurden von der Firma Fermentas bezogen. Zur direkten Klonierung von PCR-Produkten in den pDrive-Vektor kam der *PCR Cloning kit* (QIAGEN) nach Anweisung des Herstellers zum Einsatz.

2.2.3.6 Transformation von *E. coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* TOP 10 Zellen (Kap. 2.1.1) mit Ligationsprodukten oder Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook und Russell [2001]. Die Transformation elektrokompeter BL21 Ril Plus bzw. BL21PRO-Zellen mit Vektoren für die Proteinexpression wurde nach der Methode von Dower et al. [1988] mittels eines *Gene Pulser*-Elektroporationsgerätes (BioRad) durchgeführt. Die anschließende Selektion transformierter Zellen erfolgte auf LB-Agar-Platten, mit dem der plasmidkodierte Resistenz entsprechenden Antibiotikum. Gegebenenfalls wurde zur Selektion von TOP10-Zellen den LB-Agar-Platten X-Gal (40 μ g/ml) für eine Blau-Weiß-Selektion zugesetzt.

2.2.3.7 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA wurde der ABI PRISM™ *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Reaktions-

ansatz enthielt 300-400 ng Plasmid-DNA bzw. 15-40 ng PCR-Produkt und 10 pmol des entsprechenden Starteroligonukleotids (Tabelle 2:). Die Sequenzreaktion, die Produktaufreinigung und –analyse mittels eines automatischen ABI 3130XL DNA-Sequenzierers wurden von Dr. Martin Meixner (DLMBC, Rüdersdorf) durchgeführt. Nachfolgend aufgelistete Oligonukleotide wurden in die Sequenzierung eingesetzt:

Tabelle 2: Zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'→3')	Target
M13-seq-Fw	ACGACGTTGTAAAACGACGG	pDrive, pKL23
M13-seq-Rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC	pDrive, pKL23
pPROTet-seqFw	TCATTAAAGAGGAGAAAGGTACCC	pPROTet.E
pPROTet-seqRev	CCATGGGTACCTTTCTCCTCT	pPROTet.E
pBAD-rev	GATTTAATCTGTATCAGG	pBAD/Thio-TOPO
pCOLD-fw	CACGCCATATCGCCGAAAGG	pCOLD
pCOLD-rev	TGGCAGGGATCTTAGATTCTG	pCOLD
RpoT1-522R	AACCAGCCTAGAAACAAAGAC	AtRpoTm
AtRpoTm-1423FW	GTGGACAGAATCTGGGCTAATG	AtRpoTm
AtRpoTm-2424Rev	TGCAGCTTCAAACATCTCTTCC	AtRpoTm
RpoT1-2400	AAGCTGCAAGAGCTATCAAG	AtRpoTm
AtRpoTm335FW	AGCTAGGCTTGCAGCTATACCG	AtRpoTm
AtRpoTmp-813FW	ACTGGTGGTGATAACGGTTGTG	AtRpoTmp
T2-850F	AATGATCTGCCTGATGTCC	AtRpoTmp
T2-1830F	TGATTTGTGTCGGGGTG	AtRpoTmp
RpoT2-621R	GCAGATTAGGCGCAAGC	AtRpoTmp
RpoT2-2560	TTTGGTGAATGTGCGAAG	AtRpoTmp
RpoT3-760R	GACATAACCAAACCCATCATC	AtRpoTp
RpoT3-2560F	CTCTTGGGCTTCCTGTTG	AtRpoTp
Ara1M(RpoT3)	CATCAGCTGGTTTTTCTCCTG	AtRpoTp
AtRpoTp-396FW	TGCTTTGTTTCTCAAGGGTTTG	AtRpoTp
AtRpoTp-954FW	TCGAAGGAAAAGGATTATTGACG	AtRpoTp
AtRpoTp-1528FW	GATGTTCCCATACCCGAAAAAC	AtRpoTp

2.2.3.8 5'-RACE Analyse *in vivo* und *in vitro* synthetisierter RNA-Transkripte

Die Bestimmung von 5'-Enden *in vivo* synthetisierter Transkripte aus Chloroplasten-RNA (Kap. 2.2.3.1.3) transformierter Tabak-Pflanzen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Bensing et al. [1996]. Es wurde eine 5'-RACE-Technik mit einer TAP-(*tobacco acid pyrophosphatase*) Behandlung kombiniert wie beschrieben bei Kühn et al. [2005]. Zunächst wurden die 5'-Triphosphate primärer RNA-Transkripte durch Behandlung von 5 µg cpRNA mit 10 U TAP (Epicentre Biotechnologies) für 1 h bei 37°C in Anwesenheit von 40 U RNase-Inhibitor (Fermentas) in Monophosphate umgewandelt. Als Kontrollen fungierten identische Ansätze ohne TAP. Die RNA wurde anschließend einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1) unterzogen, aus der wässrigen Phase durch die Zugabe von Ethanol/3 M Natriumacetat pH 5,2 (30:1) gefällt und in Reinstwasser gelöst. Es folgte die Ligation eines RNA-Linkers [5'-GAUAUGCGCGAAUCCUGUAGAACGAACACUAGAAGAAA-3', Argaman et al., 2001] an die 5'-Enden der Transkripte. Hierzu wurde die RNA für 1 h bei 37 °C in Anwesenheit von 10 pmol des 5'-RNA-Linkers, 50 U T4 RNA Ligase (Epicentre

Biotechnologies), 1 mM ATP und 80 U RNase-Inhibitor (Fermentas) im entsprechenden Puffer inkubiert. Kontrollreaktionen wurden ohne den RNA-Linker angesetzt. Nachfolgend wurde die RNA wie oben beschrieben einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanolpräzipitation unterworfen. Die RNA wurde in H₂O gelöst und unter Verwendung des *Omniscript RT kits* (QIAGEN) und des *nptII*-spezifischen Oligonukleotids Pa nach Angaben des Herstellers für 2 h bei 42°C revers transkribiert. Die Produkte der reversen Transkription (RT) wurden in einer ersten PCR mit dem Linker-spezifischen Oligonukleotid P1a und dem genspezifischen reversen Oligonukleotid Pb amplifiziert. In den 25 µl PCR-Ansatz wurden 4 µl der RT-Reaktion, jeweils 5 pmol Primer, 200 µM dNTPs und 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase (QIAGEN) im entsprechenden Puffer eingesetzt. Die Amplifikation beinhaltete einen initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für 2 min gefolgt von 35 Zyklen von 95°C für 20 sec, 58°C für 20 sec, 72°C für 2 min und einem finalen Elongationsschritt bei 72°C für 10 min. 1 µl der ersten PCR wurde nun als *template* in eine zweite PCR eingesetzt, die prinzipiell wie die erste durchgeführt wurde. In den 50 µl Reaktionsansatz wurden jeweils 10 pmol der Primer P1a und Pc eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 3: zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.2.3.2.1) analysiert, aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den pDrive-Vektor (QIAGEN) ligiert (Kap. 2.2.3.5). Die Ligationsprodukte wurden in *E. coli* transformiert (Kap. 2.2.3.6), Plasmid-tragende Bakterienklone durch Blau-Weiß-Selektion und die erhaltene Antibiotikaresistenz identifiziert und der Firma DLMBC zur *in vitro*-Replikation und Sequenzierung mit M13-seq-Rev Primern übergeben (Kap. 2.2.3.7).

Tabelle 3: Zur 5'-RACE-Analyse *in vivo* synthetisierter Transkripte verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Verwendung
Pa	CTGTTGTGCCCAGTCATAG	RT
Pb	ATAGTTTGTGGAGAATTTTCGCTTCC	1. PCR
Pc	CTGTGTTAAGCATAGGGCCTAACTAGC	2. PCR
P1a	CGAATTCCTGTAGAACGAACACTAGAAG	1./2. PCR

Zur Bestimmung von Transkriptionsinitiationsorten *in vitro* synthetisierter RNAs wurden die Transkriptionsassays wie unter Kap. 2.2.7.3 beschrieben durchgeführt, jedoch mit jeweils 400 µM ATP, GTP, CTP und UTP sowie ohne den Zusatz von radioaktiv-markiertem UTP. Nach der Aufreinigung wurde die RNA in Wasser gelöst, einer TAP-Behandlung und 5'-RACE-Analyse unterzogen, wobei jeweils lediglich 1/10 der oben beschriebenen Reaktionsvolumina für die TAP- und Ligationsreaktionen verwendet wurde. Zusätzlich wurde ein neuer RNA-Linker (5'-GUGAUCCAACCGACGCGACAAGCUAAUGCAAGANN-3') verwendet, der zur besseren statistischen Auswertbarkeit der PCR-Produkte am 3'-Ende drei zufällig synthetisierte Nukleotide aufwies. Parallel zu den ligierten Transkripten (+L) wurden nicht-ligierte Transkripte (-L) in Kontrollreaktionen analysiert. Für die Reverse Transkription und anschließende PCR (Kap. 2.2.3.3) wurden die reversen Oligonukleotide P2hisa und P3hisa verwendet. Die Positionen dieser Oligos, die an die *hisa* Terminatorregion eingesetzter pKL23-Derivate binden, sind in Abbildung 8 angezeigt. Als vorwärts-Oligonukleotid in der 40 Zyklen umfassenden PCR diente das an die 5'-Linkersequenz bindende Oligonukleotid RUMSH 1. Gegebenenfalls wurde eine zweite PCR mit den Oligonukleotiden RUMSH2 und P3hisa durchgeführt, in die 0,1-1 µl der ersten PCR als Matrize eingesetzt wurden. Spezifische Produkte der „+L“-Reaktion wurden wie oben beschrieben kloniert und sequenziert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 4: zu entnehmen.

Tabelle 4: Zur 5'-RACE-Analyse *in vitro* synthetisierter Transkripte verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Verwendung
P2hisa	CACATCGCCTGAAAGACT	RT
RUMSH1	TGATCCAACCGACGCGAC	1. PCR
P3hisa	GGATGATGGTGATGATGGTGG	1./2. PCR
RUMSH2	ACCGACGCGACAAGCTAATGC	2. PCR

2.2.4 Chloroplastenpräparation und *Run On*-Transkription

Die Isolation von Chloroplasten aus *Nicotiana tabacum* wurde nach einem modifizierten von Grissem et al. [1986] durchgeführt. Die Anzucht von Wildtyp und mutagenisierten Pflanzen erfolgte unter Standardbedingungen (Kap. 2.2.1). Alle Arbeitsschritte zur Chloroplastenisolierung wurden bei 4°C durchgeführt. 6 g Blätter vier Wochen alter Pflanzen wurden in einem *Waring blender* in 150 ml Isolationspuffer (25 mM Hepes-KOH pH 7,6; 350 mM Sorbitol, 0,4 mM Na-Isoascorbat; 2 mM EDTA) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch 3 Lagen Miracloth (Calbiochem) filtriert und anschließend in einer Sorvall-Zentrifuge (GS-3 Rotor) zentrifugiert (2000 x g, 6 min, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml Isolationspuffer resuspendiert und in einem diskontinuierlichen 40% / 80%-Percoll-Gradienten in einer Sorvall-Zentrifuge (HB-6 Rotor) zentrifugiert (6500 x g, 4°C, 25 min). Intakte Chloroplasten wurden an der Gradienten-Interphase gesammelt, mit Isolationspuffer auf 40 ml verdünnt und erneut in einer Sorvall-Zentrifuge (HB-6 Rotor) zentrifugiert (2000 x g, 4°C, 3 min). Das resultierende Chloroplasten-Pellet wurde in 200 µl Isolationspuffer resuspendiert und die Chloroplastenzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Isolation von Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte ebenso wie oben beschrieben aus 20 g Blattmaterial 8 Wochen alter WT-Pflanzen.

Die *Run On*-Transkription erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Mullet und Klein [1987]. Hierzu wurden 5×10^7 Chloroplasten in 45 µl Puffer D (50 mM Tris-HCl pH 7,0; 10 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 3 mM β-Merkaptoethanol) durch Auf- und Abpipettieren mechanisch aufgeschlossen. Nach Zugabe von 100 µl Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 0,2 mM CTP, GTP, ATP; 0,01 mM UTP; 50 µCi α-³²P-UTP (Amersham); 40 U of RNase-Inhibitor (Fermentas); 10 mM β-Merkaptoethanol) wurde der Ansatz für 15 min bei 25°C inkubiert. Zur Untersuchung des möglichen RNA-Polymerase-Inhibitors Cyclothiazomycin B1 wurde die Reaktion in Gegenwart von 500 µM Cyclothiazomycin (Stammlösung in DMSO) durchgeführt. Parallel wurden Kontrollansätze in entsprechender Menge DMSO oder 500 µM Thiostrepton (Stammlösung in DMSO) mitgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 5% Sarcosyl) beendet. Die radioaktiven *Run On*-Transkripte wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und einer Ethanol-fällung unterzogen. Die Transkripte wurden in 100 µl H₂O resuspendiert, für 5 min bei 95°C denaturiert und mit jeweils 1 µg genspezifischen DNA-Fragmenten hybridisiert. Hierzu wurden zuvor die Genfragmente aus Plastiden- oder Plasmid-DNA durch PCR mit den in Tabelle 5: aufgeführten Oligonukleotidpaaren amplifiziert und mit Hilfe einer *96-well Bio-Dot* Mikrofiltrationsapparatur (BioRad) und UV-Vernetzung auf einer Nylon Hybond-N⁺ Membran (Amersham) fixiert. Die Hybridisierungsergebnisse wurden durch Autoradiographie in einem Phosphorimager (*Molecular Imager FX*, BioRad) analysiert.

Tabelle 5: Für die Amplifikation spezifischer Genregionen verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')	5' Position im cpGenom*
nptII fw nptII rev	GGTTGAACAAGATGGATTGCAC ATACCGTAAAGCACGAGGAAGC	-
Nt-rpoB-fw Nt-rpoB-rev	GCTGCTTGTCGTTCCAACC GGATTGGCTCTGGTTCGTTTAG	25802 26520
Nt-clpP-fw Nt-clpP-rev	GGCCAAGAGGTTGATAGCGAGATTTC GCTAGACGTTTGGTAATTCTCTCCTCCGAC	73573 73354
Nt-psbA-fw Nt-psbA-rev	ACTTGGCGTAGCTTGTTACATGGGTC ACTGAATAGGGAGCCGCCGAATA	1213 962
At-atpB-fw At-atpB-rev	AGGTCCTGTCTGATACTCGCA ATCTAAAGGATCTACCGCTGGATA	53022 53766
At-atpH-fw At-atpH-rev	TTTCTGCTGCTTCGGTTATTG GCTAATGCTACAACAGGCCATA	13275 13479
At-atpF-fw At-atpF-rev	GATTCTTTTCGTTTACTTGGGTCAC TTTAATATCCTCTGCTTTTCGGTTATC	11544 12428
At-ndhI-fw At-ndhI-rev	GTCAACAACCCCTACGAGCTGC TCAATTTCGTGACGATCATAAGTGG	119278 119649
At-clpP-fw At-clpP-rev	CCGCTAGGATAAAGGATGCTATTG CCAAGAGGTTGATACCGAAATC	70690 70908
At-psaB-fw At-psaB-rev	CGGGTCATATGTATAGAACGAACCTTG CAAGCCGAAATATCACAAGTACCAC	38234 39092
At-psaC-fw At-psaC-rev	ATTAGAAATGATACCTTGGGATGGAT TGTTTCATGCCATAAAATAAATCGAAC	117392 117536
At-psbA-fw At-psbA-rev	ACTTCTGTTTTTATTATCGCATTCATTG TCCATACCAAGGTTAGCACGG	515 1368
At-psbE-fw At-psbE-rev	TTCATTGCGGGCTGGTTATT CAAAGGATCAAAACGGCCTGT	64161 64289
At-psbG-fw At-psbG-rev	GGTCAAGACTTTCAGCCTATG TCTCTGAAGTAGATGATGGTGGATAGA	50016 50549
At-accD-fw At-accD-rev	ATGGTTGGGATGAGCGTTCT AAGTACCCGGATCAATCGAAA	57223 57885
At-rrn16-fw At-rrn16-rev	ATTGGGCGTAAAGCGTCTGTA GTAACGACTTCGGGCATGG	101522 102402
At-rbcL-fw At-rbcL-rev	CAACTGTGTGGACCGATGG CCTACTACTGTACCCGCGTGAA	55157 55955
At-rps4-fw At-rps4-rev	ATCTTAGAAACCAATCACGCTCC AAACCGACGCATTTCTTATCT	45314 45779
At-rps8-fw At-rps8-rev	GATCGACTAACATCACGGAAGTATTG TCTCGGTCTGTCATTATACCTTGA	80147 80423
At-rpl23-fw At-rpl23-rev	ACAGAAATAAAGCATTGGGTTCGAA ACCCGGTTGAAGCGTAATGA	85958 86107
At-petB-fw At-petB-rev	TAGTAAATATGTTCTCCGCATGTC GACGGCCGTAAAGAAGAGGTAAT	75710 76235
At-petD-fw At-petD-rev	TAGCTAAAGGTATGGGTCACAATTATTAC AATCAAAAAGACGGTTGTTCGC	77242 77594
At-rpoB-fw At-rpoB-rev	TATTATATGATAGCGGCAGGAAATT ATAGGAGGATTCTTTTCGCCACT	24542 25372
At-ycf1-fw At-ycf1-rev	AATTTCGGTCTGTTGTGGTCGG TGCTAAATGCAGAGGCGCA	109465/129184 109665/128984

*Nt cpGenom: EMBL-Datenbankeintrag unter Acc.-Nr. Z00044), At cpGenom: EMBL-Datenbankeintrag unter Acc.-Nr. AP000423

2.2.5 Proteinarbeitstechniken

2.2.5.1 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

2.2.5.1.1 *Plasmide zur Expression rekombinanter Proteine*

Die kodierenden Sequenzen für RpoTm (AS 43-976, At1g68990), RpoTmp (AS 105-1011, At5g15700) und RpoTp (AS 96-993, At2g24120) wurden wie beschrieben bei Kühn et al. [2007] kloniert. Die resultierenden Vektoren pBAD/Thio-His-RpoTm, pBAD/Thio-His-RpoTmp, pBAD/Thio-His-RpoTp ermöglichten die Expression Thioredoxin (Trx)-Hexahistidin (His)-fusionierter Proteine und wurden von K. Kühn (pBAD/Thio-His-RpoTm) und A. Weihe (pBAD/Thio-His-RpoTmp/Tp) zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich wurden die kodierenden Sequenzen für RpoTm, RpoTmp und RpoTp zur Proteinexpression ohne Thioredoxin-tag in den Vektor pCold DNAI (TaKaRa) kloniert. Hierzu wurden die zuvor klonierten RpoTm-, RpoTmp- und RpoTp-Sequenzen aus den Vektoren pBAD/Thio-His-RpoTm, pBAD/Thio-His-RpoTmp und pBAD/Thio-His-RpoTp mit den Oligonukleotidpaaren RpoTm-pCOLD-Fw/RpoTm-pCOLD-Rev, RpoTmp-pCOLD-Fw /RpoTmp-pCOLD-Rev und RpoTp-pCOLD-Fw/RpoTp-pCOLD-Rev amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den pDrive-Vektor kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Die kodierenden Sequenzen wurden durch *EcoRI/PstI*-(RpoTm, AS 65-976), *SacI/XbaI*-(RpoTmp, AS 107-1011) und *XhoI/XbaI*-Spaltung (RpoTp, AS 96-993) aus dem pDrive-Vektor herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen pCold-Vektor kloniert. Die resultierenden Vektoren pCold-His-RpoTm, pCold-His-RpoTmp und pCold-His-RpoTp erlaubten die Expression der rekombinanten, lediglich mit einem His-tag versehenen Proteine.

Tabelle 6: Zur Klonierung von Proteinexpressionsvektoren verwendete Oligonukleotidpaare. Kleingeschriebene Nukleotide dienten der Insertion einer Hexahistidin-kodierenden Sequenz oder der Generierung von Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen.

Oligonukleotidpaar	Sequenz (5'→3')	Plasmid
His-RpoTm-42P pBAD-Yrev	catcatcatcatcatcatGGCGTTAGAAATGGTTTATCTATAA TGCAGCTCAGTTGAAGAAGTATG	pBAD/Thio-His-RpoTm
His-RpoTmp-104P pBAD-3rev	catcatcatcatcatcacGAGTTTTCCAAGAGCGAGAG TCAGTTGAAGAAATAAGGTGAATC	pBAD/Thio-His-RpoTmp
His-RpoTp-95P pBAD-Zrev	catcatcatcatcatcacGCTGGAACCATTAAGGAG GTTCACTGGTGCTACATGC	pBAD/Thio-His-RpoTp
RpoTm-pCOLD-Fw (<i>EcoRI</i>) RpoTm-pCOLD-Rev (<i>PstI</i>)	cagaattcGGTCAATGTTATGTGTTTGAAGG ctgcaggagAGACCGAGGAGAGGGTTAG	pCold-His-RpoTm
RpoTmp-pCOLD-Fw (<i>SacI</i>) RpoTmp-pCOLD-Rev (<i>XbaI</i>)	cagagctcAAGAGCGAGAGGTGCCTTAGT cgtctagaTCGAGACCGAGGAGAGGGTTAG	pCold-His-RpoTmp
RpoTp-pCOLD-Fw (<i>XhoI</i>) RpoTp-pCOLD-Rev (<i>XbaI</i>)	cactcgagGCTGGAACCATTAAGGAGCA cgtctagaTCGAGACCGAGGAGAGGGTTAG	pCold-His-RpoTp
Ath01860 5' ProTet (<i>PstI</i>) Ath01860 3' ProTet (<i>NotI</i>)	gggctgcagGTGAAGGTGTCATGCGGCAAG ggggcgccgcTTATCTCTGGCGATTACGT	pProTet-MetC
5'SigA (<i>BamHI</i>) 3'SigA (<i>XhoI</i>)	gggggatccGTCAAAGAAGGATTGG ggggagctcACCGCTCTCTATGGC	pTrcSigA2

Für die Konstruktion des Vektors pPRO-MetC wurde die proteinkodierende Sequenz für MetC (Pfc1, At1g01860) von Aminosäure 45-287 aus revers transkribierter Arabidopsis Gesamt-RNA (Kap. 2.2.3.1.3) durch PCR (Kap. 2.2.3.3) mit dem Oligonukleotidpaar Ath01860 5' ProTet (*PstI*)/Ath01860 3' ProTet (*NotI*) amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde *PstI/NotI* gespalten, in den entsprechend geschnittenen Vektor pPROTet.E121 (Clontech) ligiert und durch Sequenzierung (Kap. 2.2.3.7) überprüft.

Für die Konstruktion des Vektors pTrcSigA2 (zur Verfügung gestellt von H. Tandara, [Tandara, 2000]) wurde die proteinkodierende Sequenz für SigA (At1g64860) von Aminosäure 160-501 aus revers transkribierter Arabidopsis Gesamt-RNA (Kap. 2.2.3.1.3) durch PCR (Kap. 2.2.3.3) mit dem Oligonukleotidpaar 5'SigA*BamHI*/3'SigA*XhoI* amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde *BamHI/XhoI* gespalten und in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pTrcHisC (Invitrogen) ligiert.

Die für die Proteinexpression verwendeten Plasmide und für die Klonierung eingesetzten Oligonukleotide sind der Tabelle 6: zu entnehmen.

2.2.5.1.2 Proteinexpression in *E. coli*

2.2.5.1.2.1 Expression rekombinanter RNA-Polymerasen mit dem pBAD-Thio-Expressionssystem (Thio-(His)₆-AtRpoTm/mp/p)

Die mit einem Thioredoxin/His-tag fusionierten Enzyme AtRpoTm, AtRpoTp und AtRpoTmp wurden unter Verwendung des pBAD/Thio-Expressionssystems (Invitrogen) von den Vektoren pBAD/Thio-His-RpoTm, pBAD/Thio-His-RpoTmp und pBAD/Thio-His-RpoTp (Kap. 2.2.5.1.1) im *E. coli* Stamm *BL21 Codon Plus RIL* (Stratagene) exprimiert. 3 ml-Vorkulturen wurden ihrer plasmidkodierten Resistenz entsprechend in LB-Amp/Cm (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) bei einer Temperatur von 37°C und 220 rpm über Nacht angezogen. Das Animpfen der 250 ml-Hauptkultur in LB-Amp erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml der Vorkultur. Die Kultur wurde unter Standardbedingungen angezogen. Bei einer OD von ~ 0,8 wurde die heterologe Expression durch die Zugabe von 0,02% (w/v) Arabinose induziert. Die Kulturen wurden für 20 h bei 18°C und 220 rpm geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4°C) in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) geerntet. Die Analyse der Expressionskulturen erfolgte wie beschrieben unter Kap. 2.2.5.2.2.

2.2.5.1.2.2 Expression rekombinanter RNA-Polymerasen mit dem pCOLD-Expressionssystem ((His)₆-AtRpoTm/mp/p)

Die mit einem His-tag fusionierten Enzyme AtRpoTm, AtRpoTp und AtRpoTmp wurden unter Verwendung des *Cold Shock* Expressionssystems (TaKaRa) von den Vektoren pCold-His-RpoTm, pCold-His-RpoTmp und pCold-His-RpoTp (Kap. 2.2.5.1.1) im *E. coli* Stamm *BL21 Codon Plus RIL* (Stratagene) exprimiert. 3 ml-Vorkulturen wurden ihrer plasmidkodierten Resistenz entsprechend in LB-Amp/Cm (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) bei einer Temperatur von 37°C und 220 rpm über Nacht angezogen. Das Animpfen der 250 ml-Hauptkultur in LB-Amp erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml der Vorkultur. Die Kultur wurde unter Standardbedingungen angezogen. Bei einer OD von ~ 0,7 wurde die Kultur für 30 min ohne Rotation bei 15°C inkubiert. Dieser Kälteschock, sowie die folgende Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) erlaubten die Induktion der heterologen Proteinexpression. Die Kulturen wurden für 20 h bei 15°C und 220 rpm geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4°C) in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) geerntet. Die Analyse der Expressionskulturen erfolgte wie beschrieben unter Kap. 2.2.5.2.2.

2.2.5.1.2.3 Expression von rekombinantem MetC mit dem pPROtet-Expressionssystem ((His)₆-MetC)

Die Expression von At-MetC vom Vektor pPRO-MetC (Kap. 2.2.5.1.1) erfolgte im *E. coli*-Stamm *BL21PRO* (Clontech). 3 ml-Vorkulturen wurden ihrer plasmidkodierten Resistenz entsprechend in LB-Cm/Spec (34 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Spectinomycin) bei einer Temperatur von 37°C und 220 rpm über Nacht angezogen. Das Animpfen der 250 ml-Hauptkultur in LB-Cm/Spec erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml der Vorkultur. Die Kultur wurde unter Standardbedingungen angezogen. Bei einer OD von ~ 0,8 wurde die heterologe Expression durch die Zugabe von 100 ng/ml Anhydrotetracyclin induziert. Die Kulturen wurden für 6 h bei 18°C und 220 rpm geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4°C) in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) geerntet. Die Analyse der Expressionskulturen erfolgte wie beschrieben unter Kap. 2.2.5.2.2.

2.2.5.1.2.4 Expression von rekombinantem Sig1 mit dem pTrc-Expressionssystem ((His)₆-Sig1)

Die Expression von At-Sig1 vom Vektor pTrcSigA2 (Kap. 2.2.5.1.1) erfolgte im *E. coli*-Stamm *BL21 Codon Plus RIL* (Stratagene). 3 ml-Vorkulturen wurden in LB-Amp/Cm (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) bei einer Temperatur von 37°C und 220 rpm über Nacht angezogen. Das Animpfen der 250 ml-Hauptkultur in LB-Amp/Cm erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml der Vorkultur. Die Kultur wurde unter Standardbedingungen angezogen. Bei einer OD von ~ 0,8 wurde die heterologe Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden für 20 h bei 20°C und 220 rpm geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4°C) in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) geerntet. Die Analyse der Expressionskulturen erfolgte wie beschrieben unter Kap. 2.2.5.2.2.

2.2.5.1.3 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

2.2.5.1.3.1 Thio-(His)₆-AtRpoTs und (His)₆-AthRpoTs

Die heterolog exprimierten, rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen (Kap. 2.2.5.1.2.1, 2.2.5.1.2.2) wurden aus 150-300 ml *E. coli*-Kulturen (RpoTm: 300 ml, RpoTp: 200 ml, RpoTmp: 150 ml) präpariert. Alle nachfolgend beschriebenen Zentrifugationen wurden, sofern nicht anders vermerkt, in einer *Megafuge 1.0 R* (Heraeus) durchgeführt. Die geernteten Zellen wurden in 6 ml Puffer A2 resuspendiert und auf 10 2-ml-Eppendorfgefäße, die jeweils ~1g Glasperlen (Durchmesser 0,17-0,18 mm, Sartorius) enthielten, verteilt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4°C in einer Schwingmühle (*Modell MM2*, Retsch) für 10 min bei maximaler Schwingfrequenz. Nach Zentrifugation (10 min, 6000 x g, 4°C) wurden die Überstände gesammelt und die Glaskügelchen zweimal mit 300 µl Puffer A2 (5 min, maximale Frequenz) gewaschen. Die erhaltenen Überstände wurden in einem 15 ml-Polypropylenröhrchen vereinigt (~ 12 ml) und zur vollständigen Abtrennung der Glaskügelchen erneut zentrifugiert (10 min, 6000 x g, 4°C). Das Lysat und 0,3 ml (Matrixvolumen) mit Puffer A1 äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose (QIAGEN) wurden auf zwei 15 ml-Polypropylenröhrchen verteilt und über Nacht bei 4°C in einem *Mini Labroller* Rotator (Labnet) inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Proteine folgte eine Zentrifugation (2 min, 1000 x g, 4°C) und zweimaliges Waschen der Ni²⁺-NTA-Agarose mit jeweils 10 ml Puffer A3. Die Matrix wurde anschließend in 6 ml Puffer A3 resuspendiert, in eine 1-ml Polypropylen-Säule (QIAGEN) transferiert, 2 x mit 3 ml Puffer A3, 4 x mit 3 ml Puffer A4, 3 x mit 0,5 ml Puffer A5 und 3 x mit 0,5 ml Puffer A6 ge-

waschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 3 x 0,5 ml Puffer AE. Das Volumen des Eluats wurde mit Hilfe von 50000-MWCO-*Centricons* (Millipore) durch Zentrifugation (9000 x g, 4°C) in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge/Rotor SS-34 (DuPont) auf ~250 µl reduziert. Zur Einstellung, der für die Lagerung geeigneter Pufferbedingungen, wurden die konzentrierten Proteine in 10000-MWCO-Mini-Dialyseeinheiten (*Slide-A-Lyzer*, Pierce) für 16 h bei 4°C gegen Puffer AD dialysiert. Die Proteinpräparationen wurden durch SDS-PAGE analysiert (Kap. 2.2.5.2.2), wobei ein Molekulargewicht von ~ 115-117 kD für die rekombinanten Enzyme angenommen wurde. Aliquots der dialysierten Proteine wurden bei -20°C zur Verwendung innerhalb von 2-6 Wochen (RpoTp: 3 Wochen, RpoTm/RpoTmp: 6 Wochen) aufbewahrt.

Puffer A1:	100 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl; 5 mM Imidazol
Puffer A2:	Puffer A1; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin; 0,5 mM DTT
Puffer A3:	20 mM Tris/HCl pH 7,0; 300 mM NaCl; 5 mM Imidazol
Puffer A4:	20 mM Tris/HCl pH 7,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol
Puffer A5:	20 mM Tris/HCl pH 7,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
Puffer A6:	20 mM Tris/HCl pH 7,0; 300 mM NaCl; 30 mM Imidazol
Puffer AE:	20 mM Tris/HCl pH 7,0; 300 mM NaCl; 100 mM Imidazol
Puffer AD:	20 mM Tris/HCl pH 7,8; 100 mM NaCl; 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT; 50% (v/v) Glycerin

Gegebenenfalls wurden die über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigten Enzyme RpoTm und RpoTmp weiteren Reinigungsschritten unterzogen. Hierzu wurden die exprimierten Proteine aus 400 ml Bakterienkultur wie oben beschrieben über Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt. 4 ml des erhaltenen Eluats wurden unter Verwendung des *Econo*-Systems (BioRad) an eine mit Puffer H1 äquilibrierte Heparin-Matrix (Matrixvolumen: ~ 0,5 ml, Amersham Pharmacia Biotech) gebunden. Die Flussrate applizierter Puffer lag bei 0,1-0,2 ml/min. Zur Entfernung ungebundener Proteine wurde die Matrix mit Puffer H1 gewaschen bis im Eluat durch UV₂₈₀-Messung kein Protein mehr detektierbar war. Die Elution der rekombinanten RNA-Polymerasen erfolgte durch Applikation von ~ 10 ml Puffer HE. Es wurden 0,4 ml-Fractionen gesammelt, von denen jeweils 9 µl mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.5.2.2) analysiert wurden. Peakfraktionen der rekombinanten Enzyme wurden vereinigt und mit Hilfe von 50000-MWCO-*Centricons* (Millipore) durch Zentrifugation (9000 x g, 4°C) in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge/Rotor SS-34 (DuPont) auf ~1 ml reduziert. Es folgte eine Dialyse für 16 h bei 4°C gegen Puffer AD.

Zur weiteren Auftrennung der im RpoTm-Dialysat enthaltenen Proteine schloss sich eine Gel-filtrationschromatographie mit einer TSK Gel 2000 SWXL Säule (TosoHaas) an. Die Elution mit Puffer G1 erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,7 ml/min. Die gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Hochreine Fraktionen wurden vereinigt und wie beschrieben aufkonzentriert, dialysiert und gelagert.

Puffer H1:	100 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl
Puffer HE:	100 mM Tris/HCl pH 7,8; 800 mM NaCl
Puffer G1:	20 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl, 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT

2.2.5.1.3.2 (His)₆-MetC und (His)₆-Sig1

Die heterolog exprimierten, rekombinanten Proteine MetC und Sig1 (Kap. 2.2.5.1.2.3, 2.2.5.1.2.4) wurden aus 150 ml *E. coli*-Kulturen präpariert. Alle nachfolgend beschriebenen Zentrifugationen wurden, sofern nicht anders vermerkt, in einer *Megafuge 1.0 R* (Heraeus) durchgeführt. Die geernteten Zellen wurden in 5 ml Puffer B2 resuspendiert und auf 10 2-ml-Eppendorfgefäße, die jeweils ~1 g Glasperlen (Durchmesser 0,17-0,18 mm, Sartorius) enthielten, verteilt. Der Zellaufschluss erfolgte wie beschrieben unter Kap. 2.2.5.1.3.1. Die erhaltenen Überstände wurden in einem 15 ml-Polypropylenröhrchen vereinigt (~ 7 ml) und zur vollständigen Abtrennung der Glaskügelchen erneut zentrifugiert (10 min, 6000 x g, 4°C). Das Lysat und 0,15 ml (Matrixvolumen) mit Puffer B1 äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose (QIAGEN) wurden auf zwei 15 ml-Polypropylenröhrchen verteilt und über Nacht bei 4°C in einem *Mini Labroller* Rotator (Labnet) inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Proteine folgte eine Zentrifugation (2 min, 1000 x g, 4°C) und zweimaliges Waschen der Ni²⁺-NTA-Agarose mit 3 ml Puffer B3. Die Matrix wurde anschließend in 3 ml Puffer B3 resuspendiert, in eine 1-ml Polypropylen-Säule (QIAGEN) transferiert, 2 x mit 3 ml Puffer B4 und 3 x mit 0,3 ml Puffer B5 gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 3 x 0,3 ml Puffer BE. Das Volumen des Eluats wurde mit Hilfe von 10000-MWCO-*Centricons* (Millipore) durch Zentrifugation (9000 x g, 4°C) in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge/Rotor SS-34 (DuPont) auf ~250 µl reduziert. Die aufkonzentrierten Proteine wurden in 10000-MWCO-Mini-Dialyseeinheiten (*Slide-A-Lyzer*, Pierce) für 16 h bei 4°C gegen Puffer BD dialysiert. Die Proteinpräparationen wurden durch SDS-PAGE und Immunodetektion analysiert (Kap. 2.2.5.2), wobei bei MetC von einem Molekulargewicht von 35,3 kD und bei Sig1 von 43,1 kD ausgegangen wurde. Aliquots der dialysierten Proteine wurden bei -20°C zur Verwendung innerhalb von 4 Wochen aufbewahrt.

Puffer B1:	100 mM Tris/HCl, pH 7,8; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol
Puffer B2:	Puffer B1, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin; 0,5 mM DTT
Puffer B3:	20 mM Tris/HCl, pH 7,0; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol
Puffer B4:	20 mM Tris/HCl, pH 7,0; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol
Puffer B5:	20 mM Tris/HCl, pH 7,0; 500 mM NaCl; 40 mM Imidazol
Puffer BE:	20 mM Tris/HCl, pH 7,0; 500 mM NaCl; 200 mM Imidazol
Puffer BD:	20 mM Tris/HCl, pH 7,8; 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) Glycerin

2.2.5.2 Proteinanalyse

2.2.5.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration rekombinanter Proteine erfolgte durch Vergleich der Intensität Coomassie-gefärbter Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 2.2.5.2.2) mit einer BSA-Standardreihe.

2.2.5.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Gesamtproteinanalyse von Expressionskulturen (Kap. 2.2.5.1.2) wurden 100-200 µl der Kultur für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50-100 µl 1 x Ladepuf-

fer resuspendiert und 5 min bei 95°C denaturiert. Zur Analyse in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen (Kap. 2.2.5.2.2) wurden jeweils 5-10 µl des Überstandes eingesetzt. Zur Analyse aufgereinigter rekombinanter Proteine (Kap. 2.2.5.1.3) wurde die Probe angemessen verdünnt und mit 2 x Probenpuffer versetzt.

Nach Vorbereitung der Proteine erfolgte deren elektrophoretische Auftrennung in diskontinuierlichen, denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli [1970] unter Verwendung des *Mighty Small II Vertical*-Elektrophoresesystems (Hoefer). Die Elektrophorese wurde für ca. 1,5 h bei einer Spannung von 150-200 V durchgeführt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde parallel ein Molekulargewichtsmarker (#SM0661 oder #SM0671, Fermentas) aufgetragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Coomassie-Färbung bzw. durch Membrantransfer und Immunodetektion (Kap. 2.2.5.2.3).

4 x Ladepuffer:	0,32 M Tris/HCl pH 6,8; 0,1 M EDTA; 0,4 M DTT; 8% (w/v) SDS, 4% (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Trenngel:	8% oder 10% Acrylamid (Gel 30, Roth); 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS
Sammelgel:	4% Acrylamid (Gel 30, Roth); 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS
Laufpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung:	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in Entfärbelösung
Entfärbelösung:	0,25 % (v/v) Isopropanol; 0,1 % (v/v) Essigsäure

Zur qualitativen Kontrolle hochaufgereinigter Proteine (Kap. 2.2.5.1.3.1) wurde eine Silberfärbung der Polyacrylamidgele durchgeführt. Hierzu wurden die Gele 20 min in Lösung A, 20 min in Lösung B, 15 min in Lösung C, 10 min in Lösung B, 10 min in H₂O, 15 min in Lösung D, 10 sec in H₂O, 1 min in Lösung E, 5-20 min in Lösung F und 1 min in Lösung B inkubiert.

Lösung A:	50% Methanol; 12% Essigsäure; 2% CuCl ₂ ; 1% ZnCl ₂
Lösung B:	10% Ethanol; 5% Essigsäure
Lösung C:	0,01% KMnO ₄
Lösung D:	0,1% AgNO ₃
Lösung E:	10% K ₂ CO ₃
Lösung F:	2% K ₂ CO ₃ ; 0,01% Formaldehyd

2.2.5.2.3 Membrantransfer von Proteinen und Immunodetektion

Die in der SDS-PAGE nach ihren Molekularmassen aufgetrennten Proteine (Kap. 2.2.5.2.2) wurden mit Hilfe einer *Semi Dry* Blot-Apparatur (BioRad) 1 h bei 20 V auf Nitrozellulose-Membranen (*Hybond-C extra*, Amersham Biosciences) elektrotransferiert.

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen für 2 h in Blockingpuffer inkubiert, anschließend 2 x für 5 min in TBST gewaschen, für 2 h mit dem primären Antikörper inkubiert, 6 x für 10 min in TBST gewaschen, für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert, 6 x für 10 min in TBST, 10 min in TBS und 3 x für 1 min in AP-Puffer gewaschen. Die Detektion spezifischer Proteinbanden erfolgte bei Verwendung eines mit Alkalischer Phosphatase-konjugierten zweiten Antikörpers durch 5-20

minütige Inkubation der Membran in AP-Substratlösung. Die enzymatische Reaktion wurde durch Waschen der Membran in H₂O beendet. Bei Verwendung eines mit Peroxidase-konjugierten zweiten Antikörpers erfolgte die Detektion mit Hilfe des *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) nach Angaben des Herstellers und Röntgenfilmen (*Hyperfilm ECL*) der Firma Amersham. Die Antikörperverdünnungen erfolgten in TBST-BSA.

Transferpuffer:	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,0375% (w/v) SDS
TBS:	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl
Blockingpuffer	3% (w/v) BSA in TBS
TBST:	0,05% (v/v) Tween 20 in TBS
TBST-BSA:	1% (w/v) BSA in TBST
AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂
AP-Substratlösung:	0,033% (w/v) NBT; 0,0165% (w/v) BCIP in AP-Puffer

Die verwendeten Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 7: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Anbieter
Anti-His	Maus IgG, Anti-Polyhistidin	1:10000	Sigma
Zweiter Antikörper	Anti-Maus IgG-Peroxidase-Konjugat	1:3000	Sigma
Zweiter Antikörper	Anti-Maus IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat	1:10000	Sigma

2.2.6 Elektrophoretischer Mobilitätsassay (EMSA)

2.2.6.1 Radioaktive Markierung von tRNAs

Die 5'-Enden von 400 ng *in vitro* synthetisierter tRNA (Kap. 2.2.7.2) wurden mit 10 U T4-Polynukleotidkinase (PNK, Fermentas) in Gegenwart von 50 µCi [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, Amersham) im entsprechenden Puffer gemäß den Empfehlungen des Herstellers für 30 min bei 37°C markiert. Nicht-inkorporierte Nukleotide wurden mittels *MicroSpin G-50* Säulen (Amersham Biosciences) nach dem Protokoll des Herstellers entfernt. Die Endmarkierung der tRNA wurde mit Hilfe eines *Bioscan QC 2000* Szintillationsmeßgerätes überprüft.

2.2.6.2 tRNA-Bindeassay

tRNA-Bindeassays erfolgten nach einem modifizierten Protokoll von Hanaoka et al. [2003]. Jeweils 0,8 pmol oder 1,6 pmol (40 oder 80 nM) der rekombinanten, über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigten Enzyme Thio-His-AtRpoTm/mp/p (Kap. 2.2.5.1.3.1) wurden für 30 min bei 30°C mit 0,4 pmol (20 nM) radioaktivmarkierter tRNA (Kap. 2.2.6.1) in 20 µl Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 25% Glycerin; 5 mM DTT) inkubiert. Gegebenenfalls wurde nicht-radioaktivmarkierte tRNA in 100-fachem Überschuss (40 pmol; 2000 nM) als Kompetitor zugegeben. Die tRNA/Protein-Komplexe wurden durch Elektrophorese auf nativen 5%igen Polyacrylamidgelen wie beschrieben unter Kap. 2.2.3.2.4 aufgetrennt und analysiert.

2.2.7 *In vitro* Transkription

2.2.7.1 *In vitro*-Transkriptionsmatrizen

2.2.7.1.1 Konstruktion von Promotorplasmiden

Zur Konstruktion von Promotorplasmiden wurden mitochondriale und plastidäre Promotorregionen wurden aus Arabidopsis Gesamt-DNA (Kap. 2.2.3.1.1) durch PCR (Kap. 2.2.3.3) mit den in Tabelle 8: aufgelisteten Oligonukleotidpaaren amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden entsprechend der durch PCR generierten Restriktionsschnittstellen mit *SacI/EcoRI* bzw. *SacI/PstI* geschnitten und stromaufwärts von zwei Terminationssequenzen [Barnes und Tuley, 1983; Gardner, 1982] in den entsprechend geschnittenen pKL23-Vektor [Liere und Maliga, 1999] ligiert (vgl. Abbildung 8). Zur Klonierung des Vektors pKL23-*Patp8-Tatp9* wurde das PCR-Produkt über die generierten Schnittstellen *PstI/EcoRI* in den entsprechend geschnittenen Vektor pKL-*Patp8-A* ligiert. Die Aufreinigung der klonierten Promotorplasmide aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des QIAGEN *Plasmid Midi Kits*. Die Plasmide wurden gegebenenfalls durch *XhoI*-, *SpeI*- oder *EcoRI*-Spaltung linearisiert und mit Hilfe des *QIAquick spin columns Kits* (QIAGEN) aufgereinigt.

Tabelle 8: Zur Klonierung von Promotorkonstrukten verwendete Oligonukleotidpaare. Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind klein geschrieben. Grau hinterlegte Plasmide wurden von Frau Kristina Kühn kloniert und zur Verfügung gestellt [Kühn, 2005]. n. b. : nicht bekannt

Name	Sequenz (5'→3')	Konstrukt	NEP-Promotor
Ath AccD P1 Fw AthAccD P1 Rev	gcagagctcGGAGTGTATATTCTTTCGTGTCA gcagaattcTGAAAAGAAGGATTTCTTATATTGTG	pKL23- <i>PaccD-P1</i>	<i>PaccD-252</i> ^a
Ath AccD P2 Fw Ath AccD P2 Rev	gcagagctcAAGAAAATCCTTCTTTTCATTTAGAA gcagaattcCATTTTCTATTTCAGAGTAAGCAAAACA	pKL23- <i>PaccD-P2</i>	<i>PaccD-172</i> ^a
Ath AccD P2 Fw AthAccD P3 Rev	gcagagctcAAGAAAATCCTTCTTTTCATTTAGAA gcagaattcCCATAGAGCTTCTGGCCTCT	pKL23- <i>PaccD-P3</i>	<i>PaccD-89</i> ^b
Ath rrn16 5' Ath rrn16 3'	ggggagctcTGAGTTTCTATTGACTTGCT ggggaattcAAGTCATAACTTGTATCCAGTCGC	pKL23- <i>Prn16</i>	<i>Prn16-Pc-139</i> ^c
Ath rpoB 5' Ath rpoB 3'	ggggagctcTCAATTTATTATATGTTTATCTGC ggggaattcTTGGAATTTTATAAGAAATAGA	pKL23- <i>PrpoB</i>	<i>PrpoB-300</i> ^a
Ath ycf1 Fw Ath ycf1 Rev	gcagagctcCCATATCCCAATTCATTCA gcagaattcATAGAGTCCGACCACAACGA	pKL23- <i>Pycf1</i>	<i>Pycf1-39</i> ^a <i>Pycf1-104</i> ^a
PAth atpB Fw PAth atpB Rev	gcagagctcCGGATATGCTAAAATGAAAATACG gcagaattcTGAAGGAATAGTCATTTTCAAGCTC	pKL23- <i>PatpB</i>	<i>PatpB-318</i> ^a
PAth rps15 Fw PAth rps15 Rev	gcagagctcTGCACAAATATGAGGGATTGTT gcagaattcGGATCCCCTGCTTTCTTCTT	pKL23- <i>Prps15</i>	<i>Prps15-139</i> ^a
PAth rps4 Fw PAth rps4 Rev	gcagagctcTGGGTAAAAGAGTTTGATCTTTGC gcagaattcTGATAAATGACGTGAAATACACTCC	pKL23- <i>Prps4</i>	<i>Prps4-151</i> ^a
Cp-trnG(UCC) Fw Cp-trnG(UCC) Rev	gcagagctcACCCCGATTACTTTGTT gcagaattcTTCATTGAAAGGGAAGGACT	pKL23- <i>cp-trnG</i>	<i>PtrnG-15/13</i> ^d
Ath-cp-trnM(CAU) fw Ath-cp-trnM(CAU) rev	gcagagctcTCATTGTTTATTGGTATTGCTTAGAA gcagaattcGGATCGAAAGACGATAAAAAACA	pKL23- <i>cp-trnM</i>	n. b.
Ath-cp-trnE(UUC) fw Ath-cp-trnE(UUC) rev	gcagagctcAAGCTAGTCATACCATTTTCAATTTCA gcagaattcGCATCGACCCAGGAAGAAAT	pKL23- <i>cp-trnE</i>	n. b.
Ath-cp-trnT fw Ath-cp-trnT rev	gcagagctcTTCCCAAATGAGCTACTAACCA gcagaattcAGACTTTCAAATGAAATTTGACTATT	pKL23- <i>cp-trnT</i>	n. b.

Ath-mt-trnS fw Ath-mt-trnS rev	gcagagctcGAGAAGAAGATTTTAATTCAGCTT gcagaattcCTCCCCGCTCCTAGTCAC	pKL23-mt-trnS	n. b.
Ath-mt-trnY,E fw Ath-mt-trnY,E rev	gcagagctcGCGCTCTTCGATGAAGAAAA gcagaattcCGGCCGAGAATGAGTACCTA	pKL23-mt-trnY,E	n. b.
Oe-PatpA-fw Oe-PatpA-rev	gcagagctcAGCTCTTTCCAATCCGGTTC gcagaattcTCTCGCCAGAGAAAAGAAA	pKL23-PatpA	PatpA-209 ^f
Mt-Patp1 Fw Mt-Patp1 Rev	cagagctcGGTCCAAGCCCAAGTATT gcagaattcTCGGATAGCATTGTGGCATA	pKL23-Patp1	Patp1-1947 ^g Patp1-1898 ^g
Ath Tatp9 fw Ath-Tatp9 rev	tctgcagTACGATCTAAAATGATTCCAA gtgaattcTCGACCGAAGAAATGAGTAA	pKL23-Patp8-Tatp9	Patp8-228/226 ^g Tatp9 ^h
pKL23-atp6-1-A-F pKL23-atp6-1-A-R	cagcgagctcCACCACGAGTTCAGACCT cagcctgcagTCCAGACAGCTTCACTCCGTC	pKL23-atp6-1-A	Patp6-1-156 ^g Patp6-1-200 ^g
pKL23-atp6-1-B-F pKL23-atp6-1-B-R	cagcgagctcGTTCTGCTTGATTAGGCGAATGC cagcctgcagCGGTTTCATCGCTTACTTATCCA	pKL23-atp6-1-B	Patp6-1-916/913 ^g
pKL23-atp6-2-F pKL23-atp6-2-R	cagcgagctcGGTTCTCTCTCAGTTCGGTCTA cagcctgcagGTAGCATCCCGCCGATCT	pKL23-atp6-2	Patp6-2-436 ^g Patp6-2-507 ^g
pKL23-atp8-F pKL23-atp8-R	cagcgagctcCCTGTACATACAAAGATCTAGGCAGC cagcctgcagAACAAAAGCATGGGAGAAAACC	pKL23-atp8-A	Patp8-157 ^g Patp8-228/226 ^g
pKL23-atp9-F pKL23-atp9-R	cagcgagctcCTTTGGATAATGGTCTAGCCGAGT cagcctgcagTGACAACTCTAGGGCCAAG	pKL23-atp9	Patp9-487 ^g Patp9-652 ^g
pKL23-cox2-F pKL23-cox2-R	cagcgagctcGTTGCCTTGCTTACCACACC cagcctgcagAGATCACTCTCTAAAGCAGCAGTC	pKL23-cox2	Pcox2-210 ^g Pcox2-481 ^g
pKL23-rrn18-F pKL23-rrn18-R	cagcgagctcAGTTGCTTATCCAGGCTTGGTGTG cagcctgcagGCGTACTACTTCCCAACCTTCTGTG	pKL23-rrn18	Prrn18-69 ^{g,i} Prrn18-156 ^g
pKL23-rrn26-F pKL23-rrn26-R	cagcgagctcAAAGGCGTTATTGCTGTGCTTCC cagcctgcagCCGCTCGAATCAAAACGTTC	pKL23-rrn26	Prrn26-893 ^g
pKL23-trnM-F pKL23-trnM-R	cagcgagctcGATTGATTCAATGAAAGTCCC cagcctgcagCCGCTTCTTCTTCTACAAG	pKL23-trnM	PtrnM-98 ^g

^a[Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007], ^b[Hanaoka et al., 2005], ^c[Sriraman et al., 1998], ^dSwiatecka-Hagenbruch (unveröffentlichte Daten), ^e[Binder und Brennicke, 1993], ^f[Kühn et al., 2005], ^g[Forner et al., 2007], ^h[Giese et al., 1996]

Zur Klonierung kurzer Promotorfragmente wurden komplementäre Oligonukleotidstränge in äquimolaren Mengen gemischt, für 10 min bei 85°C inkubiert und graduell auf Raumtemperatur zurück gekühlt. Die beim *annealing* entstehenden Restriktionsschnittstellen ermöglichten die direkte Klonierung der Fragmente in den *SacI/EcoRI* geschnittenen pKL23-Vektor. Die verwendeten Oligonukleotidpaare sind der Tabelle 9: zu entnehmen.

Tabelle 9: Zur Klonierung kurzer Promotorfragmente und Promotormutagenese verwendete Oligonukleotide. Durch *primer annealing* entstehende Restriktionsendonukleaseschnittstellen sind klein, Promotor-Kernsequenzen fett gedruckt. Mutagenisierte Nukleotide sind rot hervorgehoben.

Name	Sequenz (5'→3')	Konstrukt	NEP-Promotor
AtPrrn18(-156,WT) F AtPrrn18(-156,WT) R	cATCGATTGATAGAATAATAC CGT ATATAATCAGg aattcCTGATTATATACGTATTATTCTATCAATCGATgagct	pKL23-Prrn18-B	Prrn18-156
AthPatp8-2(-233C,-232C) F AthPatp8-2(-233C,-232C) R	cGATCTTTTTCCATACCATAA CACC TATAGAATg aattcATTCTATAGGTGTTATGGTATGGAAAAAGATCgagct	pKL23-Patp8-CAcc	Patp8-228/226

AthPatp8-2(-234T,-233G) F AthPatp8-2(-234T,-233G) R	cGATCTTTTTCCATACCATAA ACTG ATATAGAATg aattcATTCTATATCAGTTATGGTATGGAAAAAGATCgagct	pKL23-Patp8- CtgA	
AthPatp8-2(-235A,-234C) F AthPatp8-2(-235A,-234C) R	cGATCTTTTTCCATACCATAA ACTA TATAGAATg aattcATTCTATATAGTTTATGGTATGGAAAAAGATCgagct	pKL23-Patp8- acTA	
Ath-Patp8-2(-228/-226) F Ath-Patp8-2(-228/-226) R	cGATCTTTTTCCATACCATAA CATA TATAGAATg aattcATTCTATATATGTTATGGTATGGAAAAAGATCgagct	pKL23-Patp8-B	
At-Patp8-2(-228/-226)kurzF At-Patp8-2(-228/-226)kurzR	cTACCATAA CATA TATAGAAG aattcTTCTATATATGTTATGGTAgagct	pKL23-Patp8- C-	
AtPatp8-2/Patp6-1-156 F AtPatp8-2/Patp6-1-156 R	cGATCTTTTTCCATACC CATA ACATAAGAGAAGAg aattcTCTTCTCTTATGTTATGGTATGGAAAAAGATCgagct	pKL23-Patp8- 2/atp6-1	
AtPatp8-2 agaga F AtPatp8-2 agaga R	cGATCTTTTTCCATACC CATA ACATAAGAGAAATg aattcATTCTCTTATGTTATGGTATGGAAAAAGATCgagct	pKL23-Patp8- agaga	
AtPatp8-2(-228/-226)jagaaF AtPatp8-2(-228/-226)jagaaR	cGATCTTTTTCCATACC CATA ACATAAGAAGAAATg aattcATTCTTCTTATGTTATGGTATGGAAAAAGATCgagct	pKL23-Patp8- agaa	
AtPatp8-2(-228/-226)jagagF AtPatp8-2(-228/-226)jagagR	cGATCTTTTTCCATACCATAA CATA AGAGGAATg aattcATTCTCTTATGTTATGGTATGGAAAAAGATCgagct	pKL23-Patp8- agag	
AtPatp6-1(-200,WT) F AtPatp6-1(-200,WT) R	cAGTGCAGCAGCCAATAATA CGT ATATAAGAAGg aattcCTTCTTATATACGTATTATGGCTGCTGACTgagct	pKL23-Patp6- 1-B	Patp6-1- 200
AtPatp6-1(-156,WT) F AtPatp6-1(-156,WT) R	cCGGGATCAAACATCAATCT CATA AGAGAAGAg aattcTCTTCTCTTATGAGATTGATAGTTTGATCCCGgagct	pKL23-Patp6- 1-C	
AtPatp6-1-156/Patp8-2 F AtPatp6-1-156/Patp8-2 R	cCGGGATCAAACATCAATCT CATA TATAGAATCGg aattcCGATTCTATATATGAGATTGATAGTTTGATCCCGgagct	pKL23-Patp6-1 /atp8-2	
AtPatp6-1(-156) +A F AtPatp6-1(-156) +A R	cCGGGATCAAACATCAATCT CATA AGAGAAGAg aattcTCTTCTCTTATGAGATTGTATAGTTTGATCCCGgagct	pKL23-Patp6-1 +A	Patp6-1- 156
AtPatp6-1(-156) tatg F AtPatp6-1(-156) tatg R	cCGGGATCAAACATCAATCT CATA TATGAAGAg aattcTCTTCATATATGAGATTGATAGTTTGATCCCGgagct	pKL23-Patp6- 1-tatg	
AtPatp6-1(-156) tata F AtPatp6-1(-156) tata R	cCGGGATCAAACATCAATCT CATA TATAAAGAg aattcTCTTTATATATGAGATTGATAGTTTGATCCCGgagct	pKL23-Patp6- 1-tata	
AtPatp6-2(-436,WT) F AtPatp6-2(-436,WT) R	cTTGCTTTCATCTTGAATTA AGT ATATAGAAAAG aattcTTTTCTATATACTTAATCAAGATGAAAGCAAgagct	pKL23-Patp6- 2-B	
AtPatp6-2(-436,ccTA) F AtPatp6-2(-436,ccTA) R	cTTGCTTTCATCTTGAATTA ACCT ATATAGAAAAG aattcTTTTCTATATAGGTAATCAAGATGAAAGCAAgagct	pKL23-Patp6- 2-ccTA	
AtPatp6-2(-436,AccA) F AtPatp6-2(-436,AccA) R	cTTGCTTTCATCTTGAATTA ACC ATATAGAAAAG aattcTTTTCTATATAGGTTAATCAAGATGAAAGCAAgagct	pKL23-Patp6- 2-AccA	Patp6-2- 436
AtPatp6-2(-436,AGat) F AtPatp6-2(-436,AGat) R	cTTGCTTTCATCTTGAATTA AGAT TATAGAAAAG aattcTTTTCTATAATCTTAATCAAGATGAAAGCAAgagct	pKL23-Patp6- 2-AGat	
AtPatp6-2(-436,cGTA) F AtPatp6-2(-436,cGTA) R	cTTGCTTTCATCTTGAATTA CGT ATATAGAAAAG aattcTTTTCTATATACGTAATCAAGATGAAAGCAAgagct	pKL23-Patp6- 2-cGTA	
AtPcox2(-481,WT) F AtPcox2(-481,WT) R	cAGCTATCTAATGAATATTC ATTAG ATAATAGAg aattcTCTATTATCTAATGAATATTCATTAGATAGCTgagct	pKL23-Pcox2- B	
AtPcox2(-481,tcTA) F AtPcox2(-481,tcTA) R	cAGCTATCTAATGAATATTC CTAG ATAATAGAg aattcTCTATTATCTAGAGAATATTCATTAGATAGCTgagct	pKL23-Pcox2- tcTA	
AtPcox2(-481, AcgA) F AtPcox2(-481, AcgA) R	cAGCTATCTAATGAATATTC CAG AGATAATAGAg aattcTCTATTATCTCGTGAATATTCATTAGATAGCTgagct	pKL23-Pcox2- AcgA	Pcox2-481
AtPcox2(-481, ATct) F AtPcox2(-481, ATct) R	cAGCTATCTAATGAATATTC ATCT GATAATAGAg aattcTCTATTATCAGATGAATATTCATTAGATAGCTgagct	pKL23-Pcox2- B	
AtPcox2(-481, caTA) F AtPcox2(-481, caTA) R	cAGCTATCTAATGAATATTC CATAG ATAATAGAg aattcTCTATTATCTATGGAATATTCATTAGATAGCTgagct	pKLcox2-caTA	
AtPatp9(-487, WT) F AtPatp9(-487, WT) R	cGATCCTCCTATGTCTTATT GGT ATGTGATACAg aattcTGTATCACATACCAATAAGACATAGGAGGATCgagct	pKL23-Patp9-B	Patp9-487
AtPatp9(-487, ccTA) F AtPatp9(-487, ccTA) R	cGATCCTCCTATGTCTTATT CCT ATGTGATACAg aattcTGTATCACATAGGAATAAGACATAGGAGGATCgagct	pKLatp9-ccTA	
AtPatp9(-487, GccA) F AtPatp9(-487, GccA) R	cGATCCTCCTATGTCTTATT GCC ATGTGATACAg aattcTGTATCACATGGCAATAAGACATAGGAGGATCgagct	pKL23-Patp9- GccA	
AtPatp9(-487, GGat) F AtPatp9(-487, GGat) R	cGATCCTCCTATGTCTTATT GGAT TGTGATACAg aattcTGTATCACAAATCCAATAAGACATAGGAGGATCgagct	pKL23-Patp9- GGat	

AtPatp9(-487, caTA) F AtPatp9(-487, caTA) R	cGATCCTCCTATGTCTTATT CATAT GTGATACag aattcTGTATCACATATGAATAAGACATAGGAGGATCgagct	pKL23-Patp9- caTA	
Pycf1-104 WT kurz F Pycf1-104 WT kurz R	cATCCCTTTGGTGTGTCATTGAC ATA AGAGATGTCg aattcGACATCTCTTATGTCAATGACACCAAAGGGATgagct	pKL23-ycf1- 104	Pycf1-104
AtPycf1(-39,WT) F AtPycf1(-39,WT) R	cGGAAAGTTGCAAAATCAT CATATA ATAATCCAg aattcTGGATTATTATATGATGATTTTGCAACTTTCgagct	pKL23-ycf1-39	Pycf1-39

2.2.7.1.2 Synthese aufgeschmolzener Promotormatrizen

Die Synthese von linearen und aufgeschmolzenen („bubble“) 70 bp-Patp9 und Patp8 Promotor- und Nicht-Promotormatrizen erfolgte durch *annealing* der in Tabelle 10: aufgeführten Oligonukleotidpaare nach einem Protokoll von Matsunaga und Jaehning [2004]. Hierzu wurden jeweils 200 pmol der Oligonukleotide in 20 µl Reinstwasser für 6 min auf 96°C erhitzt und anschließend mit 0,1°C/sec auf 25°C in einem *Peltier Thermal Cycler PTC-200* (Biozym) zurückgekühlt. Zur Überprüfung der *annealing*-Effizienz wurden die DNA-Fragmente mittels nativer PAGE (Kap. 2.2.3.2.4) analysiert.

Tabelle 10: Zur Synthese von linearen und aufgeschmolzenen 70 bp-Patp9 und Patp8 Promotor- und Nicht-Promotormatrizen verwendete Oligonukleotidpaare.

Name	Sequenz (5'→3')	NEP-Promotor
Patp9-239 lin F	CCATCGATCTCACAACTATCAATTTTCATAAGAGAAGACGAAGACGGATC AAATTGAATAATCGAAGACC	Patp9-239
Patp9-239 lin R	GGTCTTCGATTATTCAATTTGATCCGTCTTCGTCTTCTCTTATGAAATTG ATAGTTTGTGAGATCGATGG	
Patp9-239 bubble F	CCATCGATCTCACAACTATCAATTTTCATgacatAGACGAAGACGGAT- CAAATTGAATAATCGAAGACC	Patp9-239
Patp9-239 lin R	GGTCTTCGATTATTCAATTTGATCCGTCTTCGTCTTCTCTTATGAAATTG ATAGTTTGTGAGATCGATGG	
Patp9-239 no prom bubble F	CCATCGATCTCACAACTATCAATTTTGACGTTGTGAGACGAAGACGGATC AAATTGAATAATCGAAGACC	-
Patp9-239 no prom bubble R	GGTCTTCGATTATTCAATTTGATCCGTCTTCGTCTTCGGTGTAGAAATTG ATAGTTTGTGAGATCGATGG	
Patp8-2-228 lin F	CCGTCAGATCTTTTTCCATACCATAACATATATAGAATCGATTTTCTTTT CTGATCGCTAGCCTGCCGCC	Patp8-228
Patp8-2-228 lin R	GGCGGCAGGCTAGCGATCAGAAAAGAAAATCGATTCTATATATGTTATGG TATGGAAAAGATCTGACGG	
Patp8-2-228 bubble F	CCGTCAGATCTTTTTCCATACCATAACATAGTCGATGTCGATTTTCTTTT CTGATCGCTAGCCTGCCGCC	Patp8-228
Patp8-2-228 lin R	GGCGGCAGGCTAGCGATCAGAAAAGAAAATCGATTCTATATATGTTATGG TATGGAAAAGATCTGACGG	

2.2.7.1.3 Topoisomerase-Behandlung von Promotorkonstrukten

Zur Entspannung negativ-superhelikaler DNA kam Topoisomerase I aus *E. coli* (Fermentas) nach Angaben des Herstellers zum Einsatz. 10 µg des Promotorplasmids wurden mit 15 U Topoisomerase I für 1 h bei 37°C inkubiert. Parallel wurde ein Reaktionsansatz ohne Topoisomerase mitgeführt. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C folgte ein Protein-Verdau mit 0,54 U Proteinase K (Fermentas) für 1 h bei 37°C. Die Proteinase K wurde anschließend bei 70°C für 20 min hitzeinaktiviert. Zur Entfernung der eingesetzten Enzyme folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Die DNA wurde mit Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt und 2 x mit 70% Ethanol gewaschen. Zur Analyse des Entspannungsgrades der

DNA wurde diese in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt (Kap. 2.2.3.2.1), mit Ethidiumbromid nachgefärbt und durch UV-Transillumination (*Gel Doc XR System*, BioRad) visualisiert.

2.2.7.1.4 Synthese von RNA-Matrizen

Als unspezifische RNA-Matrize für die *in vitro*-Transkription diente ein RNA-Längenstandard. Dieser wurde mit Hilfe des *RNA Century Marker Template Sets* (Ambion) durch Transkription mit T7-RNA-Polymerase (*Maxi-Script Kit*, Ambion) in Gegenwart von jeweils 0,5 mM UTP/ATP/GTP/CTP nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Die DNA-Matrize wurde durch Behandlung mit DNaseI (Roche) verdaut. Nach Inaktivierung der DNaseI durch Zugabe von 0,5 µmol EDTA wurden nicht-inkorporierte Nukleotide mittels *MicroSpin G-50* Säulen (Amersham Biosciences) nach dem Protokoll des Herstellers abgetrennt. Zugesetzte Proteine wurden durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation entfernt. Die Konzentration des RNA-Standards wurde wie unter Kap. 2.2.3.1.4 beschrieben bestimmt und lag bei 55 ng/µl.

2.2.7.2 *In vitro*-Synthese von Arabidopsis tRNAs

Die Synthese von tRNAs wurde prinzipiell durchgeführt wie beschrieben bei Hanaoka et al. [2005]. Die Amplifikation der kodierenden Sequenzen aus Arabidopsis Gesamt-DNA erfolgte durch PCR (Kap. 2.2.3.3) mit den in Tabelle 11: aufgelisteten Oligonukleotidpaaren, die zusätzlich die Generierung eines stromaufwärts liegenden T7-Promotors erlaubten. Die PCR-Produkte wurden in den pDrive-Vektor (QIAGEN) kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Anschließend erfolgte die erneute Amplifikation der tRNA-Sequenzen aus dem pDrive-Konstrukt mit den in Tabelle 11: aufgelisteten Oligonukleotidpaaren durch *Pfu*-Polymerase (Fermentas). Die aufgereinigten PCR-Produkte (Kap. 2.2.3.2.1) wurden mit Hilfe des *RiboMAX Large Scale RNA Production Systems-T7* (Promega) nach Angaben des Herstellers *in vitro* transkribiert. Nach DNaseI-Verdau (Roche), Phenol-Chloroform-Extraktion und Isopropanolfällung wurden die Transkripte in Reinstwasser gelöst, auf denaturierenden Polyacrylamidgelen (Kap. 2.2.3.2.3) aufgetrennt, ausgeschnitten und ü. N. bei 4°C unter Schütteln mit Elutionspuffer (0,3 M Natriumacetat pH 4,5; 0,1% SDS; 1 mM EDTA) aus dem Gelstück eluiert. Nach Isopropanolfällung wurden die RNAs in Reinstwasser gelöst. Unmittelbar vor Einsatz in *in vitro*-Transkriptionsassays (Kap. 2.2.7.3) oder EMSAs (Kap. 2.2.6) wurden die tRNAs für 3 min bei 70°C in 5 mM Hepes-Puffer denaturiert und bei 0,5°C/min abgekühlt. Um eine Mg²⁺-induzierte Selbsthydrolyse der tRNAs bei hohen Temperaturen zu vermeiden, wurden zur Unterstützung der korrekten Faltung 50 mM NaCl und 10 mM MgCl₂ erst bei einer Temperatur von ca. 60°C zugegeben [Shi et al., 1998].

Tabelle 11: Zur Synthese von Arabidopsis tRNAs verwendete Oligonukleotide. Kleingeschriebene Nukleotide dienen der Generierung eines T7-Promotors.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	tRNA
Ath trnVal fw Ath trnVal rev	cagagatgcataatacgcactcactataAGGGATATAACTCAGCGGTA TAGGGATAATCAGGCTCGAACTGATGACTT	tRNA ^{Val}
Ath trnGlu fw Ath trnGlu rev	cagagatgcataatacgcactcactataGCCCCATCGTCTAGTGGTT TACCCCCAGGGGAAGTCGAATCCCCGCTGC	tRNA ^{Glu}
Ath trnGly fw Ath trnGly rev	cagagatgcataatacgcactcactataGCGGATATAGTCGAATGGTA GGCGGATAGCGGGAATCGAACCCGCGTCTT	tRNA ^{Gly}

2.2.7.3 *In vitro*-Transkriptionsassay

Die Expression und Aufreinigung der eingesetzten rekombinanten Proteine erfolgte wie beschrieben unter Kap. 2.2.5.1.2 und Kap. 2.2.5.1.3. Als DNA-Matrize dienten die unter Kap. 2.2.7.1.1 zusammengefassten mitochondrialen und plastidären Promotorkonstrukte. Die *in vitro*-Transkriptionsreaktionen wurden nach einem modifizierten Protokoll von Falkenberg et al. [2002] durchgeführt. Hierbei enthielt ein 15 µl Reaktionsansatz 9,4 mM Tris/HCl (pH 7,9), 13,33 mM NaCl, 6,7 mM KCl, 6,7 mM MgCl₂, 0,74 mM DTT, 0,067% (w/v) BSA, 6,6% Glycerin, 24 U RNase-Inhibitor, 400 oder 900 fmol rekombinante RNA-Polymerase und 200 oder 300 ng lineare oder zirkuläre *template*-DNA. Die Zugabe möglicher Transkriptionsfaktoren oder Inhibitoren ist gegebenenfalls angezeigt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von jeweils 400 µM ATP, CTP und GTP, 20 µM unmarkiertem UTP und 10 µCi (RpoTm und RpoTp) beziehungsweise 0,5 µCi (RpoTmp) [α -³²P]-UTP (3000 Ci/mmol) gestartet. Nach einer 60 minütigen Inkubation bei 28°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 115 µl RNA-Extraktionspuffer (6 M Harnstoff; 360 mM NaCl; 20 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1% (w/v) SDS) und 20 µl 2,25 M Natriumacetat (pH 5,2) gestoppt. Die Nukleinsäuren wurden mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 375 µl Ethanol und 1 µl Glycogen (20 mg/ml) gefällt und mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Die Transkripte wurden in 1 x Formamidladepuffer gelöst und durch denaturierende PAGE analysiert (Kap. 2.2.3.2.3).

In *in vitro*-Transkriptionsassays mit aufgeschmolzenen/nicht-aufgeschmolzenen Promotormatrizen (Kap. 2.2.7.1.2) wurden 5 ng doppelsträngige (*annealed*) bzw. zur Kontrolle 2,5 ng einzelsträngige Oligonukleotide eingesetzt, in Assays mit RNA-Matrize (Kap. 2.2.7.1.4) 55 ng. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Standardtranskriptionsreaktionen wurden unabhängig von der RNA-Polymerase gleiche Mengen [α -³²P]-UTP (5 oder 10 µCi/Reaktion) eingesetzt. Die Transkriptionsreaktion und Transkriptanalyse wurden ansonsten, falls nicht anders vermerkt, durchgeführt wie oben beschrieben.

3 ERGEBNISSE

3.1 *In vitro*-Transkription organellärer Promotoren durch Phagentyp-RNA-Polymerasen aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Aufklärung der transkriptionellen Rollen der Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTm, RpoTmp und RpoTp in pflanzlichen Organellen sollten *in vitro*-Experimente zur Untersuchung der Transkription mitochondrialer und plastidärer Promotoren durch diese drei Enzyme durchgeführt werden.

3.1.1 Das *in vitro*-Transkriptionssystem

Die in *in vitro*-Transkriptionsstudien eingesetzten rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTm, RpoTmp und RpoTp aus *Arabidopsis thaliana* wurden zunächst mit einem N-terminal fusionierten Thioredoxin (Trx)-Hexahistidin (His)-tag in *E. coli* exprimiert und über Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt (Kap. 2.2.5.1). Die Abbildung 8 A zeigt eine deutliche Anreicherung der rekombinanten Enzyme, deren Identität durch Immundetektion des Hexahistidin-tags (Daten nicht gezeigt, Kap. 2.2.5.2.3) sowie verschiedener RpoT-spezifischer Proteindomänen (A. Weihe, unveröffentlichte Daten) bestätigt wurde.

Die rekombinanten RNA-Polymerasen sollten auf spezifische Erkennung und Transkription von organellären Promotoren untersucht werden. Eine Voraussetzung hierfür war die Kartierung zahlreicher Transkriptionsinitiationsorte im mitochondrialen und plastidären Genom von *Arabidopsis thaliana* [Kühn et al., 2005; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007]. Zur *in vitro*-Analyse wurde eine Vielzahl dieser kartierten organellären Promotorregionen stromaufwärts der zwei *Rho*-unabhängigen, bakteriellen Attenuatoren *hisa* und *thra* [Barnes und Tuley, 1983; Gardner, 1982] in den Vektor pKL23 [Liere und Maliga, 1999] inseriert (vgl. Abbildung 8 B, Kap. 2.2.7.1.1). Schon zuvor konnte gezeigt werden, dass diese Haarnadelschleifen ausbildenden Attenuationssequenzen als effektive Terminatoren einer Phagentyp-RNA-Polymerase wirken [Liere und Maliga, 1999]. Bei Einsatz zirkulärer pKL23-Derivate in *in vitro*-Transkriptionsstudien mit rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen sollten demnach bei korrekter Initiation an den inserierten Promotoren und folgender Termination an *hisa* und/oder *thra* RNA-Transkripte mit einer definierten Länge entstehen. Zusätzlich wurden *EcoRI*-, *HindIII*- oder *XhoI*-linearisierte Promotorkonstrukte angeboten, die ebenfalls eine definierte Transkriptlänge erwarten ließen. Die Abbildung 8 B zeigt anhand des Beispiels des pKL23-*PycfI*-Vektors ein typisches, in *in vitro*-Transkriptionsanalysen

eingesetztes Promotorkonstrukt. Da *in vivo* gehäuft multiple Promotoren stromaufwärts untersuchter organellärer Gene detektiert wurden, beinhalten die eingesetzten pKL23-Derivate z. T. mehrere Transkriptionsinitiationsorte, die im Folgenden durch den Buchstaben „P“ (Promotor), gefolgt vom Gennamen und der Position des Initiationsnukleotids in Bezug auf den Beginn der kodierenden Sequenz oder reifen RNA bezeichnet wurden (hier: *Pycf1*-104 und *Pycf1*-39). Der stromaufwärts der inserierten Promotorregionen liegende T7-Promotor (P_{T7}) wurde in *in vitro*-Transkriptionsassays durch keine der rekombinanten RNA-Polymerasen erkannt (Daten nicht gezeigt) und in nachfolgenden Abbildungen ebenso wie PEP-abhängige Promotoren nicht dargestellt.

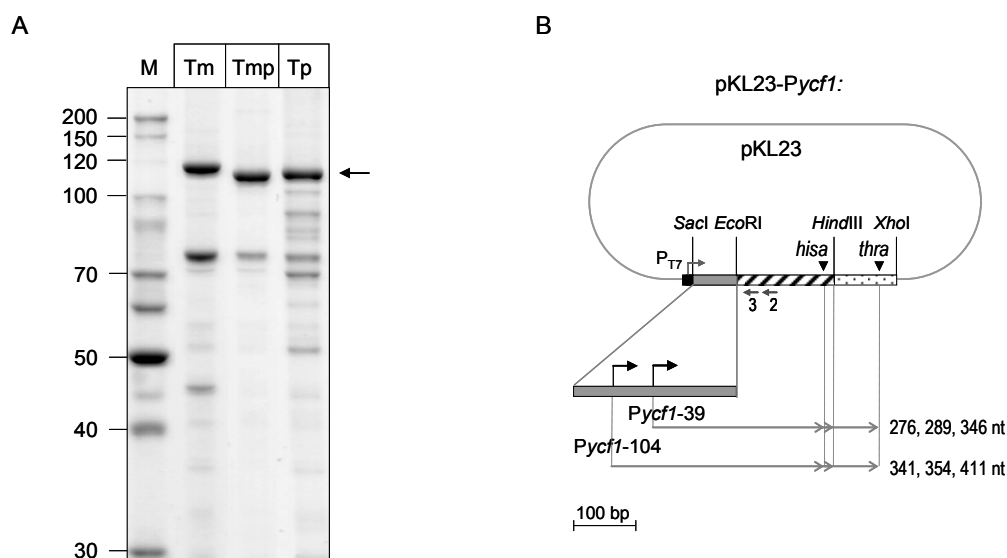


Abbildung 8: Komponenten des *in vitro*-Transkriptionssystems. (A) Aufreinigung der rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTm (Tm), RpoTmp (Tmp) und RpoTp (Tp) aus Arabidopsis ohne die durch TargetP [Emanuelsson et al., 2000] vorhergesagten Transitpeptide von 42, 104 und 95 Aminosäuren. Die N-terminal mit einem Trx-His-tag fusionierten Enzyme wurden in *E. coli* exprimiert (Kap. 2.2.5.1.2.1), über Ni^{2+} -NTA Agarose gereinigt (Kap. 2.2.5.1.3.1) und durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Gels analysiert (Kap. 2.2.5.2.2). Parallel wurde ein Molekulargewichtsmarker (M) aufgetragen; die Größen sind in kD angezeigt. Die rekombinanten Enzyme sind durch einen Pfeil markiert und korrespondieren in der Größe mit den durch ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) vorhergesagten Molekulargewichten von 117 kD für RpoTm, 116 kD für RpoTmp und 115 kD für RpoTp. (B) Schematische Darstellung des Vektors pKL23-*Pycf1*. Zur Konstruktion von pKL23-*Pycf1* wurde ein 250 bp Fragment aus Arabidopsis cpDNA (grauer Balken), das die Promotoren *Pycf1*-39 und *Pycf1*-104 enthält, über *SacI*/*EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Die erwarteten Transkripte bei Initiation an den inserierten Promotoren (gebogene Pfeile) gefolgt von einer Termination an den bakteriellen Attenuatoren *hisa* oder *thra* (gemusterte Balken) oder an der für die Linearisierung verwendeten Restriktionsschnittstelle *HindIII* sind durch horizontale graue Pfeile gekennzeichnet. Entsprechende Transkriptlängen sind angezeigt. Die Position eines T7-Promotors (P_{T7}) und die Terminationsorte innerhalb von *hisa*/*thra* (schwarze Pfeilspitzen) sind markiert. Die Lage der für die Bestimmung von Transkript-5'-Enden verwendeten Oligonukleotide P2*hisa* (2) und P3*hisa* (3) innerhalb der *hisa*-Region sind angezeigt.

Die initialen Arbeiten zur Etablierung eines *in vitro*-Transkriptionssystems mit rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau K. Kühn durchgeführt [Kühn, 2005]. Zur vergleichenden Charakterisierung der Rolle aller drei Phagentyp-RNA-Polymerasen, sollten in dieser Arbeit RpoTm, RpoTp und RpoTmp auf promotorspezifische Transkription sowohl mitochondrialer als auch plastidärer pKL23-Promotorderivate untersucht werden.

3.1.2 Selektive Erkennung mitochondrialer Promotoren durch Phagentyp-RNA-Polymerasen *in vitro*

Kürzlich konnten Kühn et al. [2005] zeigen, dass die Mehrzahl der *in vivo* kartierten mitochondrialen Promotoren von der früher für dikotyle Pflanzen beschriebenen Nonanukleotidsequenz abweicht (vgl. Kap. 1.2.3.2). Um die Fähigkeit der organellären Phagentyp-Polymerasen zur Erkennung dieser diversen mitochondrialen Promotorsequenzen zu vergleichen, wurden Konsensustyp sowie bislang nicht bekannte Promotormotive im *in vitro*-Transkriptionsassay untersucht.

Anfänglich durchgeführte *in vitro*-Transkriptionsexperimente zeigten zunächst eine im Vergleich zu RpoTm und RpoTp hohe unspezifische RNA-Polymeraseaktivität von RpoTmp an superhelikalen DNA-Matrizen (Daten nicht gezeigt). Die hohe Aktivität von RpoTmp deutete sich bereits in Experimenten zum unspezifischen Einbau von [α - 32 P]-UMP in Transkripte vom superhelikalen pKL23-Vektor an [Kühn, 2001]. Um eine bessere Darstellbarkeit der radioaktiven Transkripte in den Autoradiogrammen zu ermöglichen, wurde für die im Folgenden beschriebenen Experimente in den Studien mit RpoTmp lediglich 1/20 der in Versuchen mit RpoTm und RpoTp verwendeten [α - 32 P]-UTP-Menge eingesetzt.

Viele mitochondriale Promotoren zeichnen sich durch eine YRTA-Konsensussequenz aus und ähneln damit plastidären Typ Ia-NEP-Promotoren (vgl. Kap. 1.2.3.2). Es sollten daher für die vergleichende Analyse der Phagentyp-Polymerasen zunächst Promotoren mit einer solchen YRTA-Kernsequenz untersucht werden. Die rekombinanten Enzyme RpoTm, RpoTmp und RpoTp wurden dementsprechend auf promotorspezifische Transkription der Vektoren pKL23-*Patp8-A*, pKL23-*Prrn18* und pKL23-*Pcox2* mit den unter Abbildung 9 B dargestellten Promotoren untersucht (Abbildung 9 A). Die angebotenen Promotorsequenzen weisen typische YRTA-Motive (*Prrn18*-156, *Pcox2*-210, *Patp8*-157, *Patp8*-228/226), aber auch eine alternative Promotor-Kernsequenz auf (*Prrn18*-69; vgl. dargestellte Promotorsequenzen in Tabelle 13). Die Promotorkonstrukte wurden in zirkulär-superhelikaler (Spuren „ccc“) und linearisierter (Spuren „lin“) Form angeboten. Wie bereits von Kühn gezeigt, war RpoTm zur korrekten

Initiation an vielen der angebotenen Promotoren auf superhelikalen Vektoren fähig [Kühn, 2005].

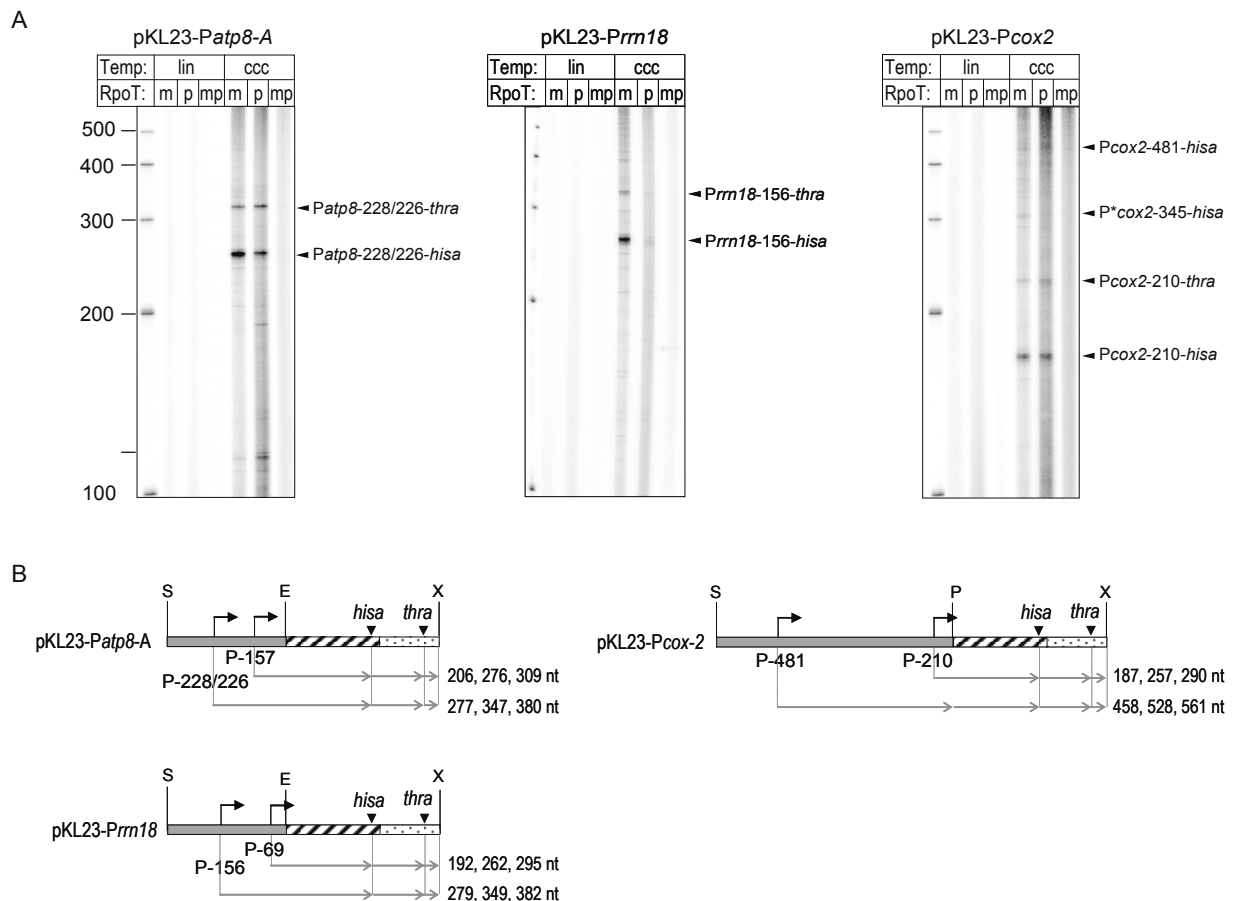


Abbildung 9: Unterschiedliche transkriptionelle Eigenschaften rekombinanter Phagentyp-RNA-Polymerasen aus Arabidopsis. (A) RpoTm (m), RpoTmp (mp) und RpoTp (p) wurden auf promotor-spezifische Transkription von den Vektoren pKL23-*Patp8-A*, pKL23-*Prm18* und pKL23-*Pcox2* getestet. Die DNA-templates (Temp) wurden sowohl in superhelikal-zirkulärer (ccc) als auch in linearer (lin) Form angeboten. Aufgrund der hohen Aktivität von RpoTmp wurden Reaktionen, die dieses Enzym enthielten, mit 1/20 der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -UTP-Menge angesetzt, wie Reaktionen mit RpoTm und RpoTp. Markierte RNA-Produkte wurden auf 5%igen Sequenzgelen parallel zu einem RNA-Längenstandard aufgetrennt (Angaben in nt) und durch Autoradiographie detektiert. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt und wurden nach der Bestimmung der Transkript-5'-Enden [Kühn, 2005] der Initiation an den entsprechenden Promotoren gefolgt von einer Termination an *hisa* (Signal P-*hisa*) und *thra* (Signal P-*thra*) zugeordnet. Bei den mit P*-345-*hisa* und P*-345-*thra* gekennzeichneten Signalen handelt es sich um nicht-spezifisch initiierte pKL23-*Pcox2* Transkripte. (B) Schematische Darstellung der Vektoren pKL23-*Patp8-A*, pKL23-*Prm18* und pKL23-*Pcox2*. Die erwarteten Transkripte bei Initiation an den inserierten Promotoren gefolgt von einer Termination an den bakteriellen Attenuatoren *hisa* oder *thra* oder an den für die Linearisierung verwendeten Restriktionsschnittstellen *EcoRI* (E) oder *XhoI* (X) sind durch horizontale graue Pfeile gekennzeichnet. Entsprechende Transkriptlängen sind angezeigt. Symbole wie in Abbildung 8 B.

Bei der Transkription des superhelikalen Vektors pKL23-*Patp8*-A mit den Promotoren *Patp8*-157 und *Patp8*-228/226 durch RpoTm konnten zwei Transkripte detektiert werden (Abbildung 9 A, Panel pKL23-*Patp8*-A, Spur 5; durch Pfeilspitzen angezeigt). Diese Produkte wiesen die für eine Initiation am *Patp8*-228/226-Promotor und folgender Termination an *hisa* (untere Bande) bzw. *thra* (obere Bande) erwarteten Längen auf. Eine anschließende Bestimmung der RNA-5'-Enden durch 5'-RACE (Kap. 2.2.3.8) zeigte in der Tat eine spezifische Initiation der Transkription durch RpoTm an *Patp8*-228/226. Dagegen konnten keine spezifisch an *Patp8*-157 initiierten Transkripte im Autoradiogramm nachgewiesen werden.

Auch von den weiteren angebotenen Promotorkonstrukten pKL23-*Prrn18* und pKL23-*Pcox2* wurden an den inserierten Promotoren durch RpoTm spezifische Transkripte synthetisiert (Abbildung 9 A, Paneele pKL23-*Prrn18* und pKL23-*Pcox2*, Spuren 5). Die einzige Ausnahme bildete der Nicht-Konsensustyp-Promotor *Prrn18*-69, der anscheinend nicht von RpoTm erkannt wurde. Ein zusätzliches Transkript (P*), das einer Initiation an keinem der *in vivo* bestimmten Startpunkte entsprach, wurde am Vektor pKL23-*Pcox2* synthetisiert und einer Initiation an P**cox2*-345 zugeordnet. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein Artefakt der *in vitro*-Transkription, da die Sequenz der entsprechenden Region starke Ähnlichkeit zu mitochondrialen Promotoren aufweist (vgl. Sequenz in Tabelle 13).

Erstaunlicherweise wurden alle hier untersuchten, von RpoTm transkribierten mitochondrialen Promotoren ebenfalls von dem ausschließlich plastidärlokalisierten Enzym RpoTp erkannt (Abbildung 9 A, Spuren 6). Die Synthese spezifischer Transkripte an den angebotenen mitochondrialen Promotoren war jedoch beim Vergleich des Verhältnisses zufällig initiiertter Transkripte zu spezifischen Transkripten etwas weniger effizient als durch RpoTm. Besonders deutlich wird dies beim Vergleich der Mengen spezifischer am *Prrn18*-156 Promotor initiiertter Produkte (Abbildung 9 A, Panel pKL23-*Prrn18*, Spur 6). Interessanterweise konnte für das dual lokalisierte Enzym RpoTnp nur eine sehr hohe, jedoch unspezifische Transkription der angebotenen DNA-Matrizen nachgewiesen werden (Abbildung 9 A, Spuren 7).

Die Ergebnisse demonstrieren zudem, dass eine Voraussetzung für die promotorspezifische Transkription durch RpoTm und RpoTp das Angebot einer superhelikalen DNA-Matrize war. Linearisierte Vektorkonstrukte lieferten ausschließlich geringe Mengen an hochmolekularen, unspezifischen Produkten (Abbildung 9 A, Spuren „lin“). Ähnliche Resultate wurden von Liere und Maliga [1999] in Versuchen mit transkriptionsaktiven Chloroplasten-Extrakten erzielt, in denen angebotene Promotoren ebenfalls von superhelikalen, nicht aber von linearen DNA-Matrizen spezifisch transkribiert wurden.

Zur genaueren Charakterisierung der transkriptionellen Eigenschaften von RpoTp im Vergleich zu RpoTm und RpoTmp wurden weitere *in vitro*-Transkriptionsexperimente durchgeführt. Es wurden zusätzliche mitochondriale Promotoren mit einer YRTA-Kernsequenz (*Patp6-1-156*, *Patp6-1-200*, *PtrnM-98*, *Prrn26-893*), aber auch verstärkt Promotoren mit alternativen Sequenzen getestet (*Patp6-2-436*, *Patp6-2-507*, *Patp9-487*, *Patp9-652*, *Patp6-1-916/913*; Abbildung 10, s. Tabelle 13 für Promotorsequenzen und *in vivo* Initiationssorte). Die drei rekombinanten Enzyme wurden auf spezifische Transkription der Vektoren pKL23-*Patp6-1-A*, pKL23-*Prrn26*, pKL23-*PtrnM*, pKL23-*Patp6-2*, pKL23-*Patp9* und pKL23-*Patp6-1-B* mit den oben beschriebenen Promotoren untersucht. Wiederum wurden auch hier bei Angebot linearer DNA-Matrizen keine spezifischen Produkte durch die Phagentyp-RNA-Polymerasen synthetisiert (Daten nicht gezeigt). Von den superhelikalen Matrizen dagegen wurden sowohl durch RpoTm als auch durch RpoTp spezifische Transkripte an den meisten der oben genannten Promotoren erzeugt (Abbildung 10 A, Spuren 1 und 2). Besonders überraschend war hierbei die Erkennung einiger Nicht-Konsensustyp-Promotoren durch RpoTp, da bislang keine plastidären Promotoren mit ähnlichen Kern-/Erkennungssequenzen bekannt sind. Allerdings war die Effizienz der RNA-Synthese durch RpoTm und RpoTp von einigen der angebotenen Promotoren nur gering (*Prrn26-893*, *PtrnM-98*, *Patp9-487*, *Patp6-1-916/913*). Der *Patp6-1-156*-Promotor, der eine starke Ähnlichkeit zu den untersuchten *Patp8-157*- und *Patp9-239*-Promotoren aufweist, wurde wie diese durch keine der RpoTs erkannt (vgl. Abbildung 9, Daten nicht gezeigt). Ebenfalls nicht erkannt wurde der Promotor *Patp9-652*, der keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen untersuchten Promotoren besitzt (Abbildung 10 A, Panel pKL23-*Patp9*).

Beim Vergleich der spezifisch durch RpoTm und RpoTp synthetisierten RNAs fällt ein deutlicher Unterschied bei der Erkennung des YRTA-Promotors *Patp6-1-200* auf, der wesentlich effizienter von RpoTm als von RpoTp transkribiert wurde (Abbildung 10 A, Panel pKL23-*Patp6-1-A*, Spuren 1, 2). Dieser Effekt wurde bereits bei der Transkription des *Prrn18-156*-Promotors (Abbildung 9) gesehen, der eine große Ähnlichkeit mit dem hier untersuchten *Patp6-1-200*-Promotor aufweist. Umgekehrt zeigte RpoTp eine im Vergleich zu RpoTm stärkere Transkription von *PtrnM-98* (Panel pKL23-*PtrnM*, Spur 2). Abgesehen davon konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Promotorerkennung durch RpoTm und RpoTp beobachtet werden. RpoTmp dagegen zeigte wiederum eine sehr hohe, jedoch vorwiegend unspezifische Transkription der angebotenen DNA-Matrizen. Überraschenderweise konnte erstmals eine, wenn auch äußerst geringe, Synthese spezifischer Transkripte durch RpoTmp

von den Promotoren *Patp6-1-200*, *Patp6-2-436*, *Patp6-2-507* und *Patp6-1-916/913* beobachtet werden (Panele pKL23-*Patp6-2* und pKL23-*Patp6-1-A* und B, Spuren 3).

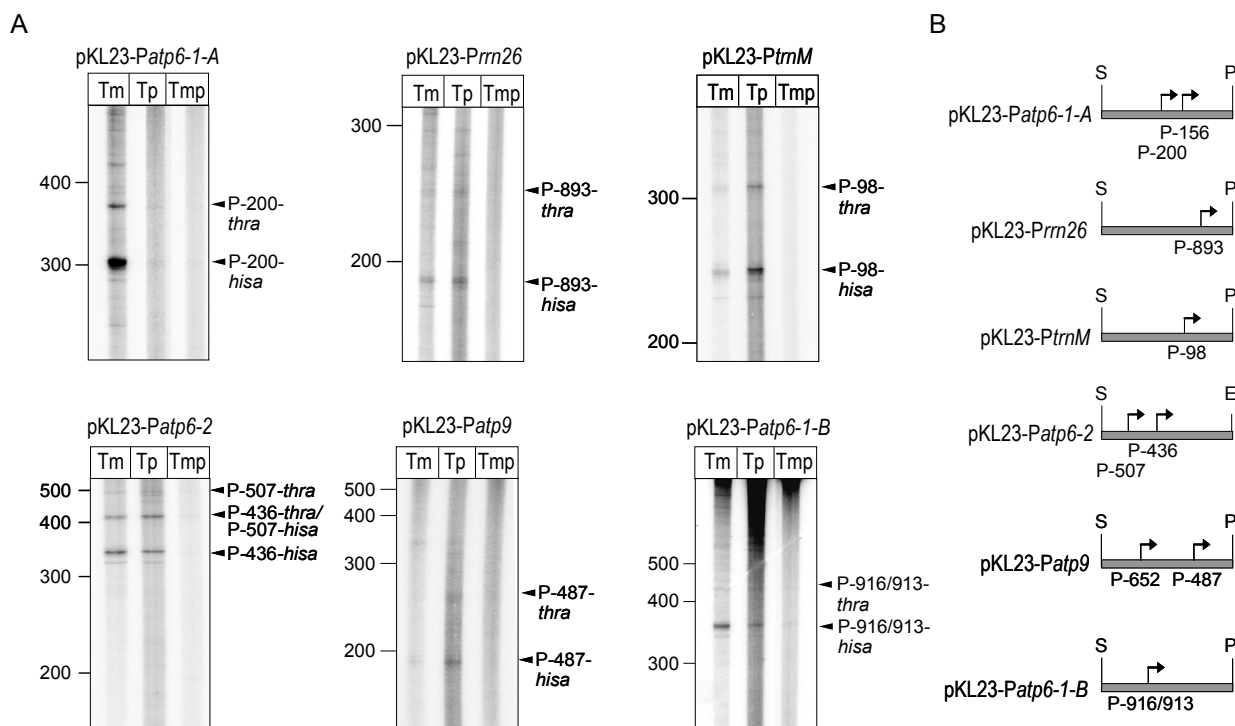


Abbildung 10: Untersuchung von RpoTm (Tm), RpoTmp (Tmp) und RpoTp (Tp) auf promotor-spezifische Transkription von den zirkulär-superhelikalen Vektoren pKL23-*Patp6-1-A*, pKL23-*Prrn26*, pKL23-*PtrnM*, pKL23-*Patp6-2*, pKL23-*Patp9* und pKL23-*Patp6-1-B*. (A) *In vitro*-Transkription. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt und wurden nach der Bestimmung der Transkript-5'-Enden [vgl. Abbildung 12, Kühn, 2005] der Initiation an den gekennzeichneten Promotoren gefolgt von einer Termination an *hisa* (Signal P-*hisa*) und *thra* (Signal P-*thra*) zugeordnet. Transkriptanalyse und Beschriftung wie beschrieben in Abbildung 9 A. (B) Schematische Darstellung der unter (A) untersuchten Promotorsequenzen. Die inserierten Promotoren wurden über *SacI*/*PstI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Symbole wie in Abbildung 8 B. Darstellung nicht maßstabsgetreu. Erwartete Transkriptlängen sind in der nachfolgenden Tabelle angezeigt:

Konstrukt	Promotor	Erwartete Transkriptlänge bei Termination an:	
		<i>hisa</i>	<i>thra</i>
pKL23- <i>Patp6-1-A</i>	<i>Patp6-1-156</i>	279 nt	349 nt
	<i>Patp6-1-200</i>	323 nt	393 nt
pKL23- <i>Patp6-1-B</i>	<i>Patp6-1-916/913</i>	369/366 nt	439/436 nt
pKL23- <i>Patp9</i>	<i>Patp9-487</i>	233 nt	303 nt
	<i>Patp9-652</i>	398 nt	468 nt
pKL23- <i>PtrnM</i>	<i>PtrnM-98</i>	258 nt	328 nt
pKL23- <i>Prrn26</i>	<i>Prrn26-893</i>	203 nt	273 nt
pKL23- <i>Patp6-2</i>	<i>Patp6-2-507</i>	421 nt	491 nt
	<i>Patp6-2-436</i>	350 nt	420 nt

Die bei der Transkription des pKL23-*Patp6-1*-B-Vektors sehr stark sichtbaren hochmolekularen RNAs (Abbildung 10 A) wurden unabhängig von der spezifischen Promotorerkennung in allen *in vitro*-Transkriptionsexperimenten beobachtet (nicht dargestellt). Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um nicht-spezifisch auf dem Plasmid initiierte RNAs und/oder um spezifische Transkripte, die nicht effizient an *hisa/thra* terminiert wurden. Letzteres spielt jedoch vermutlich eine untergeordnete Rolle, da dieses Phänomen auch bei der unspezifischen Transkription des pKL23-Vektors (ohne inserierte Promotoren) durch RpoTm, RpoTmp und RpoTp auftrat (Daten nicht gezeigt) und auch in *in vitro*-Transkriptionsstudien mit mitochondrialen Extrakten gesehen wurde [Binder et al., 1995; Hanic-Joyce und Gray, 1991; Rapp und Stern, 1992]. In den Autoradiogrammen zusätzlich zu den spezifischen Produkten auftretende Signale beruhen wahrscheinlich ebenfalls auf unspezifisch initiierten Transkripten oder einem möglicherweise veränderten Laufverhalten spezifischer RNA-Produkte.

Gelegentlich wurde eine leichte Diskrepanz zwischen den erwarteten und den tatsächlichen Längen der Transkripte beobachtet. Da die Initiationsorte durch eine zusätzlich durchgeführte Bestimmung der 5'-Enden mittels 5'-RACE-Analyse [Bensing et al., 1996; Kühn et al., 2005] jedoch eindeutig zugewiesen werden konnten und keine weiteren signifikanten Startpunkte auftraten, beruht dieser Unterschied wahrscheinlich auf einem durch Sekundärstrukturen verursachten veränderten Laufverhalten der Transkripte im Vergleich zum RNA-Längenstandard.

Makroarray-Analysen der mitochondrialen Genexpression einer Arabidopsis T-DNA-Insertionsmutante des *RpoTmp*-Gens, zeigten nach Lichtinduktion 6 Tage alter Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion der Expression des *atp1*-Gens um etwa 50%, wogegen keine weiteren mitochondrialen Gene veränderte Expressionsniveaus aufwiesen [Baba et al., 2004]. Kühn et al. [2005] konnten durch Bestimmung *in vivo* genutzter Transkriptionsinitiationsorte zwei Promotoren für das *atp1*-Gen detektieren. Es handelt sich hierbei um die Promotoren *Patp1*-1847 und *Patp1*-1898, die in ihrer, die Transkriptionsinitiationsregion betreffenden Sequenz, eine starke Ähnlichkeit zu den *in vitro* bereits untersuchten Promotoren *Patp9*-239 und *Prrn26*-893 bzw. *Patp9*-295 und *Pcox2*-210 aufweisen (vgl. dargestellte Promotorsequenzen in Tabelle 13). Obwohl RpoTmp bislang keine spezifische Erkennung der *Patp9*, *Pcox2*-210 und *Prrn26*-893 Promotoren *in vitro* zeigte (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10), sollte eine mögliche Rolle von RpoTmp an der Expression des *atp1*-Gens in *in vitro*-Transkriptionsassays überprüft werden. Der Vektor pKL23-*Patp1*, der die Promotoren *Patp1*-1847 und *Patp1*-1898 beinhaltet, wurde auf spezifische Transkription durch RpoTmp sowie durch RpoTm und RpoTp getestet (Abbildung 11). Trotzdem sowohl RpoTm als auch RpoTp

RNAs der erwarteten Größe synthetisierten (Abbildung 11 A, Spuren 1 und 2), zeigte RpoTmp keine spezifische Promotorerkennung (Spur 3).

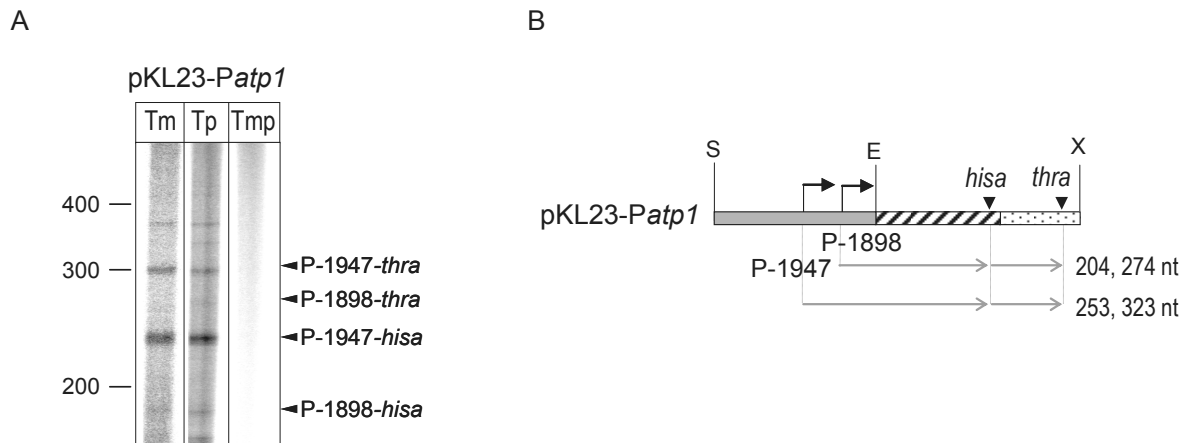


Abbildung 11: *In vitro*-Transkription der mitochondrialen Promotoren *Patp1*-1947 und *Patp1*-1898. (A) RpoTm (Tm), RpoTp (Tp) und RpoTmp (Tmp) wurden auf promotor-spezifische Transkription des superhelikalen Vektors pKL23-*Patp1* getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt und wurden nach der Bestimmung der Transkript-5'-Enden (s. Abbildung 12) der Initiation an *Patp1*-1947 und *Patp1*-1898 gefolgt von einer Termination an *hisa* und *thra* zugeordnet. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. Auf einem Gel, jedoch nicht direkt nebeneinander aufgetrennte RNAs sind durch eine durchgezogene Linie separiert. (B) Schematische Darstellung des eingesetzten Vektors. Zur Konstruktion von pKL23-*Patp1* wurde ein ~170 bp-mtDNA-Fragment, das die Promotoren *Patp1*-1947 und *Patp1*-1898 enthält, über *SacI*/*EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Die erwarteten Transkripte bei Initiation an den inserierten Promotoren gefolgt von einer Termination an *hisa* oder *thra* und entsprechende Transkriptlängen sind gekennzeichnet. Symbole wie in Abbildung 8 B.

Um die genauen 5'-Enden der durch die rekombinanten Enzyme RpoTm und RpoTp vom pKL23-*Patp1*-Vektor *in vitro* synthetisierten RNA-Transkripte zu bestimmen, wurde wiederum eine modifizierte 5'-RACE-TAP-Technik angewandt (Kap. 2.2.3.8). Die 5'-Triphosphate der Transkripte wurden hierbei zunächst durch Behandlung mit *tobacco acid pyrophosphatase* (TAP) in Monophosphate umgewandelt. Die 5'-Monophosphat-tragenden RNAs sind Substrate der RNA-Ligase, was die Ligation eines RNA-Linkers an das 5'-Ende der Transkripte ermöglichte. Die ligierten Transkripte wurden nun einer RT-PCR unterzogen und durch Agarosegelelektrophorese analysiert (+L). Als Kontrolle in der RT-PCR dienten Transkriptionsprodukte, die nicht mit dem RNA-Linker ligiert wurden (-L), um eventuelle unspezifische Amplifikationsprodukte mitgeführter DNA-Matrizen von Transkript-abhängigen Produkten zu unterscheiden. Eine Illustration der für RpoTm und RpoTp be-

stimmten 5'-Termini der vom pKL23-*Patp1*-Vektor synthetisierten Transkripte findet sich in Abbildung 12.

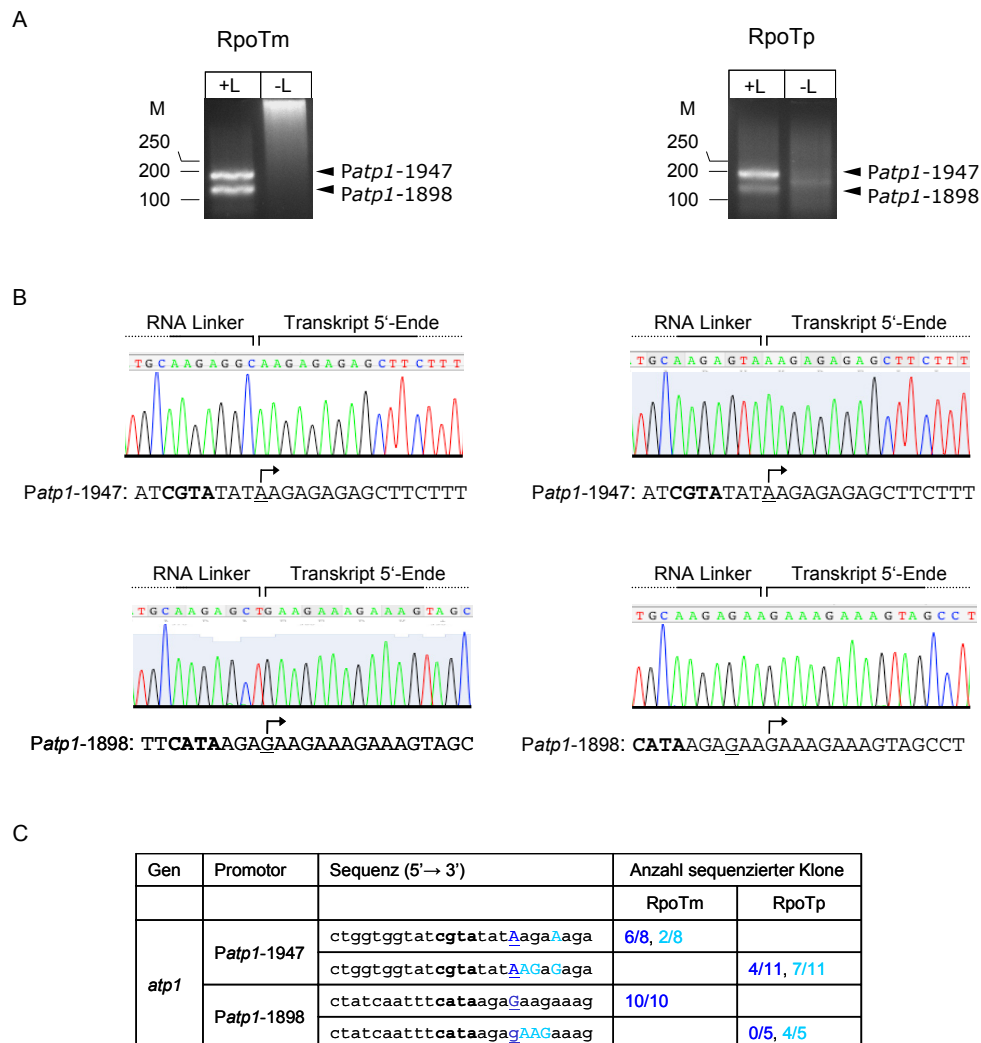


Abbildung 12: 5'-RACE der *in vitro* von RpoTm (links) und RpoTp (rechts) synthetisierten RNA von zirkulärem pKL23-*Patp1* (vgl. Abbildung 10 B). (A) Transkripte mit einem ligierten 5'-RNA-Linker (+L) und als Kontrolle nicht-ligierter Transkripte (-L) wurden einer RT-PCR unterzogen (Kap. 2.2.3.8). Die PCR-Produkte wurden parallel zu einem DNA-Längenstandard (M; Angaben in bp) in Agarosegelele aufgetrennt, kloniert und sequenziert. Die dem 5'-Ende entsprechenden Signale sind durch den dazugehörigen Promotornamen und Initiationsort gekennzeichnet. (B) Die Chromatogramme zeigen eine typische Sequenz an der Ligationsstelle klonierter 5'-RACE-Produkte. Der RNA-Linker sowie das Transkript-5'-Ende sind angezeigt. Unterhalb der Chromatogramme sind die mitochondrialen Promotorsequenzen *Patp1*-1947 und *Patp1*-1847 dargestellt. Die *in vivo* detektierten Transkriptionsinitiationsorte sind unterstrichen, die *in vitro* bestimmten durch einen gebogenen Pfeil gekennzeichnet. Promotorkernsequenzen sind fett gedruckt. (C) Tabelle der durch Klonierung und Sequenzierung von 5'-RACE-Produkten detektierten 5'-Enden der durch RpoTm und RpoTp synthetisierten Transkripte. *In vitro* detektierte Initiationsorte, die exakt den *in vivo* bestimmten Transkript-5'-Enden (unterstrichen) entsprechen, sind in der Sequenz durch dunkelblaue Großbuchstaben dargestellt, alternative *in vitro*-Startpunkte in hellblauen Großbuchstaben. Die Anzahl der sequenzierten Klone für jeden Promotor sowie die Initiationshäufigkeit an den angegebenen Nukleotiden sind farblich entsprechend angegeben.

Beide RNA-Polymerasen lieferten Transkripte deren 5'-Endbestimmung zu zwei RT-PCR-Produkten der erwarteten Größe führte (A). Die Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte, dass für RpoTm die Mehrzahl der Transkript-5'-Enden exakt den *in vivo* detektierten Initiationsorten an *Patp1*-1847 und *Patp1*-1898 entsprach, während RpoTp eine leichte Ungenauigkeit zeigte und häufig an Nukleotiden 1-3 Positionen stromabwärts der *in vivo*-Startpunkte initiierte (B, C). Eine gewisse Ungenauigkeit des rekombinanten Enzyms RpoTm bei der Initiation an den Promotoren *Patp6*-2-436 und *Patp6*-2-507 wurde ebenfalls von Kühn [2005] beobachtet und könnte auf einer leichten Unspezifität der RpoTs für das Initiationsnukleotid *in vitro* beruhen oder aber auf einer Degradation einzelner Nukleotide am 5'-Ende synthetisierter RNAs.

Eine vollständige Übersicht der Ergebnisse der *in vitro*-Transkription untersuchter mitochondrialer und auch nachfolgend untersuchter plastidärer Promotoren (Kap. 3.1.3) ist in der Tabelle 13 dargestellt.

3.1.3 Selektive Erkennung plastidärer Promotoren durch Phagentyp-RNA-Polymerasen *in vitro*

Entsprechend der *in vitro*-Analyse mitochondrialer Promotoren (Kap. 3.1.2) sollten plastidäre Promotoren aus Arabidopsis auf spezifische Erkennung durch die rekombinanten Enzyme RpoTm, RpoTmp und RpoTp getestet werden. Durch die kürzlich erfolgte Kartierung *in vivo* genutzter PEP-unabhängiger Transkriptionsinitiationsorte im plastidären Genom von Arabidopsis [Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007] standen zahlreiche Promotorsequenzen für die *in vitro*-Untersuchungen zur Verfügung.

Die untersuchten pKL23-Derivate enthielten die Typ Ia NEP-Promotoren *Prps4*-151, *PatpB*-318, *PaccD*-252 und *Pycf1*-104, die Typ Ib NEP-Promotoren *PrpoB*-300, *PaccD*-172, *Prps15*-139 und *Pycf1*-39, den *Prrn16*-139-Pc-Promotor oder den Typ II NEP-Promotor *PclpP*-58 (s. Tabelle 13 für Promotorsequenzen und *in vivo* Initiationsorte). Die pKL23-Derivate wurden zunächst in linearisierter und superhelikaler Form angeboten. Da jedoch keine spezifische Transkription von linearen Matrizen detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden die zu einem späteren Zeitpunkt untersuchten Promotorkonstrukte pKL23-*Prps4*, pKL23-*PatpB*, pKL23-*Pycf1*-104, pKL23-*Prps15* lediglich in superhelikaler Form eingesetzt.

Im Gegensatz zur *in vitro*-Transkription mitochondrialer Promotoren führten die meisten der untersuchten plastidären Promotoren nicht zur Synthese spezifischer RNAs. Auch die Bestimmung der 5'-Enden *in vitro*-synthetisierter Transkripte durch 5'-RACE-Analysen (vgl. Abbildung 12) zeigte lediglich eine leichte Präferenz von RpoTp für eine spezifische Initiati-

on. So konnten z. B. für den *PrpoB*-300 Promotor von 14 sequenzierten Klonen nur vier mit spezifischer Initiation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt; vgl. auch Abbildung 28). Darüber hinaus zeigten sich viele scheinbar zufällige Startpunkte der Transkription, ohne dabei auf einen alternativen Promotor hinzuweisen.

Eine Ausnahme bildete der YRTA-Promotor *Pycf1*-39 auf dem Vektor pKL23-*Pycf1*, der sowohl bei der Transkription durch RpoTp als auch durch das mitochondriale Enzym RpoTm zur Synthese von RNAs der erwarteten Länge führte (Abbildung 13, Panel pKL23-*Pycf1*, Spuren 1 und 2). 5'-RACE-Analysen der in *in vitro*-Transkriptionsassays entstandenen RNAs ordneten die 5'-Enden einer Initiation an *Pycf1*-39 zu (Abbildung 14, Panel pKL23-*Pycf1*).

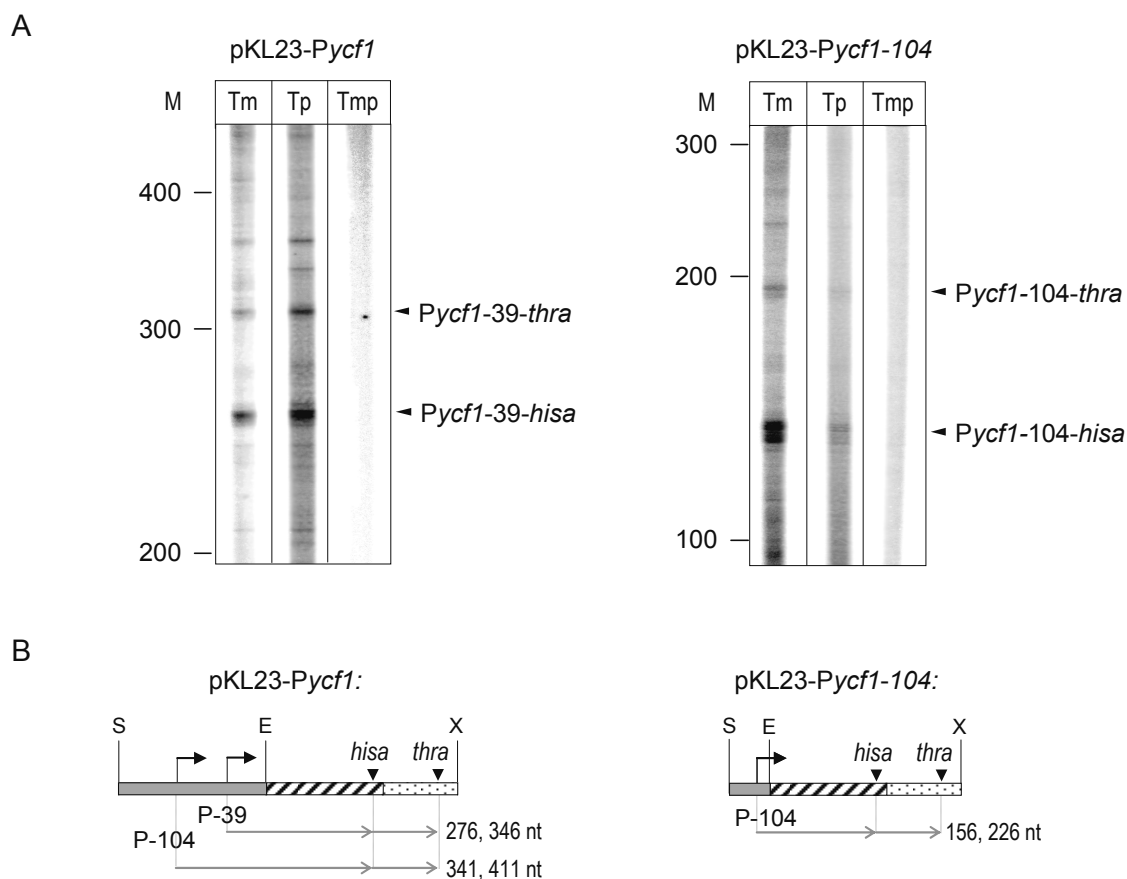


Abbildung 13: *In vitro*-Transkription der plastidären Promotoren *Pycf1*-39 und *Pycf1*-104. (A) RpoTm (Tm), RpoTp (Tp) und RpoTmp (Tmp) wurden auf promotorspezifische Transkription von den superhelikalen Vektoren pKL23-*Pycf1* (links) und pKL23-*Pycf1*-104 (rechts) getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt und wurden nach der Bestimmung der Transkript-5'-Enden (Abbildung 14) der Initiation an *Pycf1*-39 bzw. *Pycf1*-104 gefolgt von einer Termination an *hisa* und *thra* zugeordnet. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. (B) Schematische Darstellung der eingesetzten Vektoren. Zur Konstruktion von pKL23-*Pycf1* vgl. Abbildung 8 B. Zur Konstruktion von pKL23-*Pycf1*-104 wurde ein 32 bp-cpDNA-Fragment, das den Promotor *Pycf1*-104 enthält, über *SacI*/*EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Die erwarteten Transkriptlängen sind gekennzeichnet. Symbole wie in Abbildung 8 B.

Eine Initiation an dem ebenfalls auf diesem Konstrukt liegenden *Pycf1*-104-Promotor war weder durch Detektion spezifischer Signale in der *in vitro*-Transkription noch durch 5'-RACE eindeutig nachzuweisen. Da die Möglichkeit bestand, dass bei Anwesenheit zweier Promotoren auf einem Vektorkonstrukt (vgl. Abbildung 13 B, links) einer präferentiell transkribiert wird oder gering abundante Transkripte aufgrund ähnlicher Größe von anderen Signalen überdeckt werden, wurde ein zweites pKL23-Derivat kloniert, das lediglich den *Pycf1*-104 Promotor beinhaltet. Durch das Angebot des erhaltenen Konstrukts pKL23-*Pycf1*-104 konnte nun eindeutig eine Transkription des *Pycf1*-104-Promotors durch RpoTp und RpoTm nachgewiesen werden (Abbildung 13, Panel pKL23-*Pycf1*-104, Spuren 1 und 2). Die durch 5'-RACE bestimmten Initiationsorte bestätigten die korrekte Initiation durch beide Enzyme (Abbildung 14, Panel pKL23-*Pycf1*-104). Das Enzym RpoTm zeigte dahingegen keine Präferenz für einen der angebotenen Promotoren (Abbildung 13, Spuren 3).

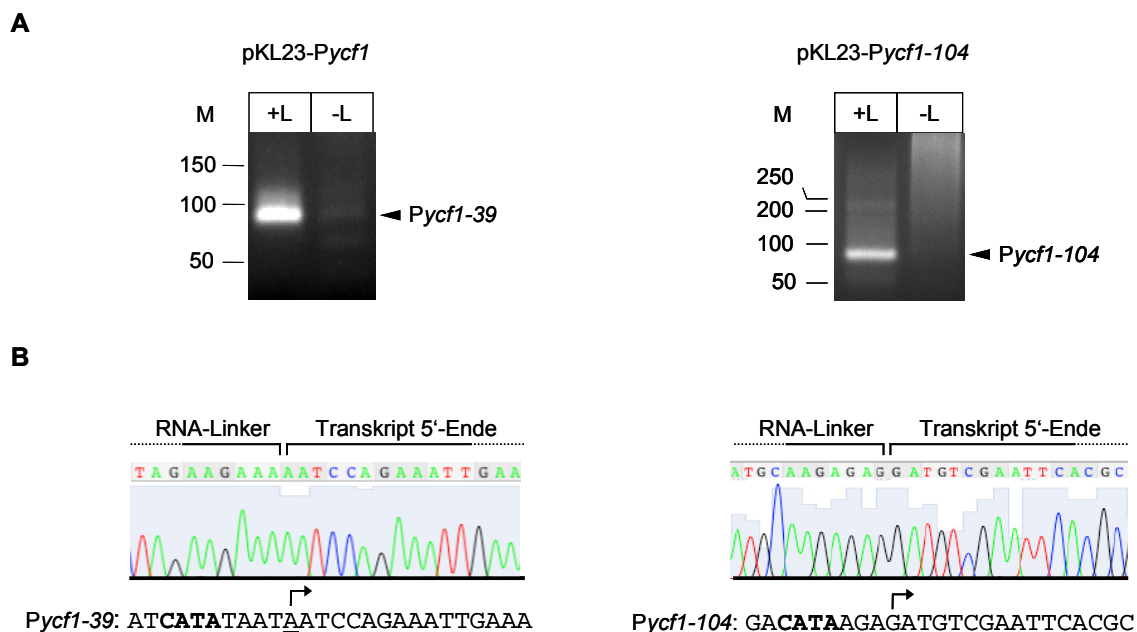


Abbildung 14: 5'-RACE der *in vitro* durch RpoTp synthetisierten RNA von zirkulärem pKL23-*Pycf1* (links) und pKL23-*Pycf1*-104 (rechts, vgl. Abbildung 13). (A) Transkripte mit einem ligierten 5'-RNA-Linker (+L) und als Kontrolle nicht-ligierte Transkripte (-L) wurden einer RT-PCR unterzogen. Die PCR-Produkte wurden parallel zu einem DNA-Längenstandard (M; Angaben in bp) in Agarosegele aufgetrennt. Das dem 5'-Ende entsprechende Signal ist durch den dazugehörigen Promotornamen und Initiationsort gekennzeichnet. (B) Die Chromatogramme zeigen eine typische Sequenz der klonierten 5'-RACE-Produkte. Unterhalb der Chromatogramme sind die plastidären Promotorsequenzen *Pycf1*-39 und *Pycf1*-104 dargestellt. Beschriftung und Symbole wie in Abbildung 12.

3.1.4 In vitro-Studien zur Transkription plastidärer tRNA-Gene

Die meisten plastidären tRNAs werden durch die plastidär kodierte RNA-Polymerase (PEP) an stromaufwärts liegenden -10/-35-Promotoren transkribiert. Einige tRNAs scheinen jedoch weder PEP- noch bekannte NEP-Promotoren in ihrem 5'-flankierenden Bereich zu besitzen [Übersicht in Marechal-Drouard et al., 1993]. Für einige dieser tRNAs konnte selbst bei Deletion des 5'-flankierenden Bereichs eine Transkriptakkumulation beobachtet werden [Gruissem et al., 1986], so dass vermutet wird, dass diese Gene möglicherweise Promotoren innerhalb der kodierenden Sequenz besitzen (vgl. Kap. 1.2.3.1). Bislang ist ungeklärt, wie und durch welche RNA-Polymerase diese Gene transkribiert werden.

Neue Studien an translationsinhibierten Plastiden aus Keimlingen und Samen von Arabidopsis zeigten trotz der Abwesenheit von PEP eine Akkumulation einiger tRNAs (M. Swiatecka-Hagenbruch, unveröffentlichte Daten). Die Bestimmung von Transkriptionsinitiationsorten deutete für einige dieser plastidären tRNAs (*trnV-UAC*, *trnM-CAU*, *trnL-UAA*, *trnE-UUC*, *trnG-UCC*, *trnG-GCC*) auf eine Initiation am ersten Nukleotid der kodierenden Sequenz (+1) hin. Zusätzlich wurde für das *trnG*-Gen, welches für tRNA^{Gly} (UCC) kodiert, neben einem PEP-Promotor (P-3), ein möglicherweise NEP-abhängiger Promotor an Position -15/-13 detektiert (M. Swiatecka-Hagenbruch, unveröffentlichte Daten).

Um zu überprüfen, ob möglicherweise Phagentyp-RNA-Polymerasen in die Transkription dieser tRNAs involviert sind, wurden in *in vitro*-Transkriptionsstudien verschiedene tRNA-Gene auf Transkription durch die rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen an internen Promotoren untersucht. Hierzu wurden die kodierenden Bereiche der plastidären tRNAs *trnM*, *trnE*, *trnT* (~ Position -90 bis +130 bezogen auf den Start der kodierenden Sequenz) in den pKL23-Vektor inseriert. Da für mitochondriale tRNA-Gene keine Transkription an internen Promotoren bekannt ist, wurden zur Kontrolle zusätzlich die kodierenden Sequenzen des *mt-trnS* und *mt-trnY,E*-Gens (Position -70 bis +152 bzw. -36 bis +203) inseriert. Die erhaltenen Konstrukte pKL23-cp-*trnM*, pKL23-cp-*trnE*, pKL23-cp-*trnT*, pKL23-cp-*trnG*, pKL23-mt-*trnS* und pKL23-mt-*trnY,E* wurden in superhelikaler Form auf spezifische Transkription durch RpoTm, RpoTmp und RpoTp untersucht.

Die *in vitro*-Studien ergaben weder für die plastidären noch für die mitochondrialen tRNA-Gene einen Hinweis auf die spezifische Transkription an Position +1 (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte ein unmittelbar vor der kodierenden Sequenz liegender Bereich die Transkription des *trnG*-Gens durch die RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTm stimulieren (Abbildung 15 A, Spuren 1 und 2).

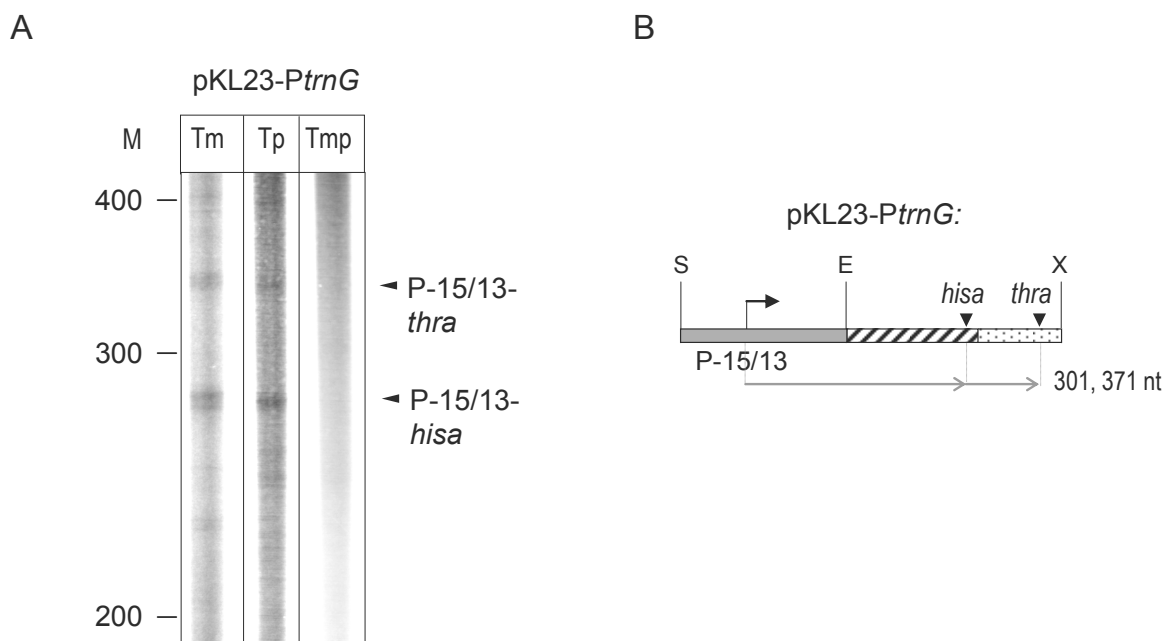


Abbildung 15: *In vitro*-Transkription des plastidären Promotors *PtrnG*-15/13. (A) RpoTm (Tm), RpoTp (Tp) und RpoTmp (Tmp) wurden auf promotorspezifische Transkription von dem superhelikalen Vektor pKL23-*cp-trnG* getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt und wurden nach der Bestimmung der Transkript-5'-Enden (Abbildung 16) der Initiation an *PtrnG*-15/13 gefolgt von einer Termination an *hisa* und *thra* zugeordnet. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. (B) Schematische Darstellung des eingesetzten Vektors. Die Klonierung von pKL23-*cp-trnG* erfolgte durch Insertion einer 200 bp *cp*-Sequenz über *SacI*/*EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23. Die erwarteten Transkriptlängen sind gekennzeichnet. Symbole wie in Abbildung 8 B.

Die Transkription des Vektors pKL23-*cp-trnG* durch die beiden rekombinanten RNAPs lieferte jeweils zwei Signale, die einer Initiation an *PtrnG*-15/13 gefolgt von einer Termination an *hisa/thra* entsprechen könnten. Die Länge der synthetisierten Produkte korrelierte jedoch nicht exakt mit den erwarteten Transkriptlängen von 301 und 371 nt (vgl. Kap. 3.1.2.), so dass mit Hilfe von 5'-RACE-Analysen die genauen 5'-Termini der durch RpoTp und RpoTm synthetisierten Transkripte bestimmt wurden (Abbildung 16). RpoTp zeigte für die Mehrzahl der Transkript-5'-Enden eine exakte Initiation an dem *in vivo* detektierten Initiationsort *PtrnG*-15 (Panel RpoTp). Das mitochondriale Enzym RpoTm war ebenfalls zur spezifischen Transkription des plastidären *PtrnG*-15/-13-Promotors fähig (Panel RpoTm), jedoch mit einer leichten Verschiebung des Initiationsortes um zwei Nukleotide (Position -17), die für 30% der Transkriptenden auch für RpoTp beobachtet wurde (Abbildung 16 C).

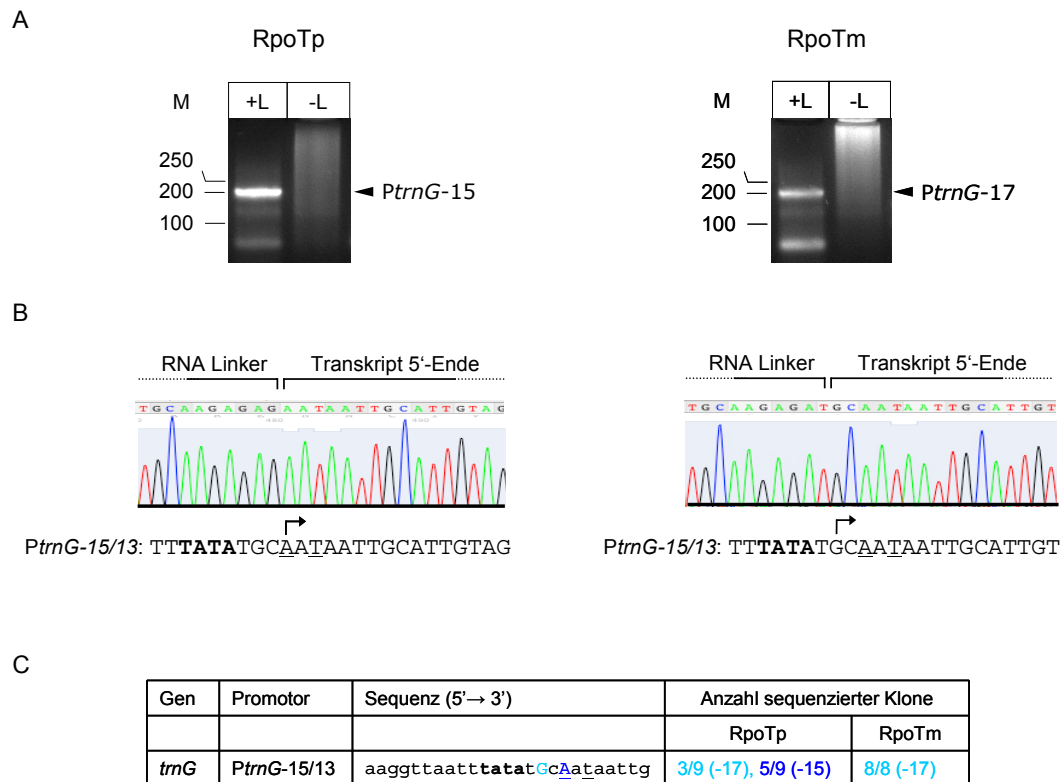


Abbildung 16: 5'-RACE der *in vitro* durch RpoTp (links) und RpoTm (rechts) synthetisierten RNA von zirkulärem pKL23-cp-*PtnG* (vgl. Abbildung 15). (A) Transkripte mit einem ligierten 5'-RNA-Linker (+L) und als Kontrolle nicht-ligierte Transkripte (-L) wurden einer RT-PCR unterzogen. Die PCR-Produkte wurden parallel zu einem DNA-Längenstandard (M; Angaben in bp) in Agarosegelen aufgetrennt. Das dem 5'-Ende entsprechende Signal ist durch den dazugehörigen Promotornamen und Initiationsort gekennzeichnet. (B) Die Chromatogramme zeigen eine typische Sequenz der klonierten 5'-RACE-Produkte. Unterhalb der Chromatogramme ist die plastidäre Promotorsequenz *PtnG*-15/13 dargestellt. (C) Während für RpoTp die Mehrzahl der sequenzierten Klone eine Initiation an der *in vivo* detektierten Position -15 zeigte, lag der Transkriptionsinitiationsort durch RpoTm zwei Nukleotide weiter stromaufwärts an Position -17 (siehe Text). Beschriftung und Symbole wie in Abbildung 12 C.

3.1.5 Promotoranalysen mit rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen im *in vitro*-Transkriptionssystem

3.1.5.1 Deletionsanalyse organellärer Promotoren

Die *in vitro*-Studien zur Transkription organellärer Promotoren in den vorangegangenen Kapiteln zeigten eine Erkennung vielfältiger Promotorarchitekturen durch RpoTm und RpoTp (Kap. 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4). Ein Vergleich der Nukleotide von -17 bis +7 um den Transkriptionsinitiationsort der durch RpoTm und RpoTp *in vitro* transkribierten Promotoren erlaubte jedoch keine eindeutige Zuordnung einer tatsächlich für die Erkennung essentiellen Nukleotidabfolge (vgl. Tabelle 13). Da die meisten der bislang analysierten Promotorsequenzen einen

Bereich von 250-300 bp umfassten, ließ sich nicht ausschließen, dass weiter vom Initiationsort entfernte Nukleotidsequenzen für die spezifische Erkennung durch die rekombinanten RNAPs im *in vitro*-Transkriptionssystem notwendig sind.

Um die RpoT-bindende DNA-Sequenz näher einzuschränken, wurden Deletionsexperimente mit dem durch RpoTm und RpoTp sehr gut erkannten *Patp8*-228/226-Promotor durchgeführt (Abbildung 17, pKL23-*Patp8*-A, Konstrukt 1). Hierfür wurde zum einen die verkürzte Promotorsequenz von -27 bis +5 (pKL23-*Patp8*-B, Konstrukt 2), zum anderen die Sequenz von -15 bis +4 (pKL23-*Patp8*-C, Konstrukt 3) in den Vektor pKL23 inseriert (Kap. 2.2.7.1.1,

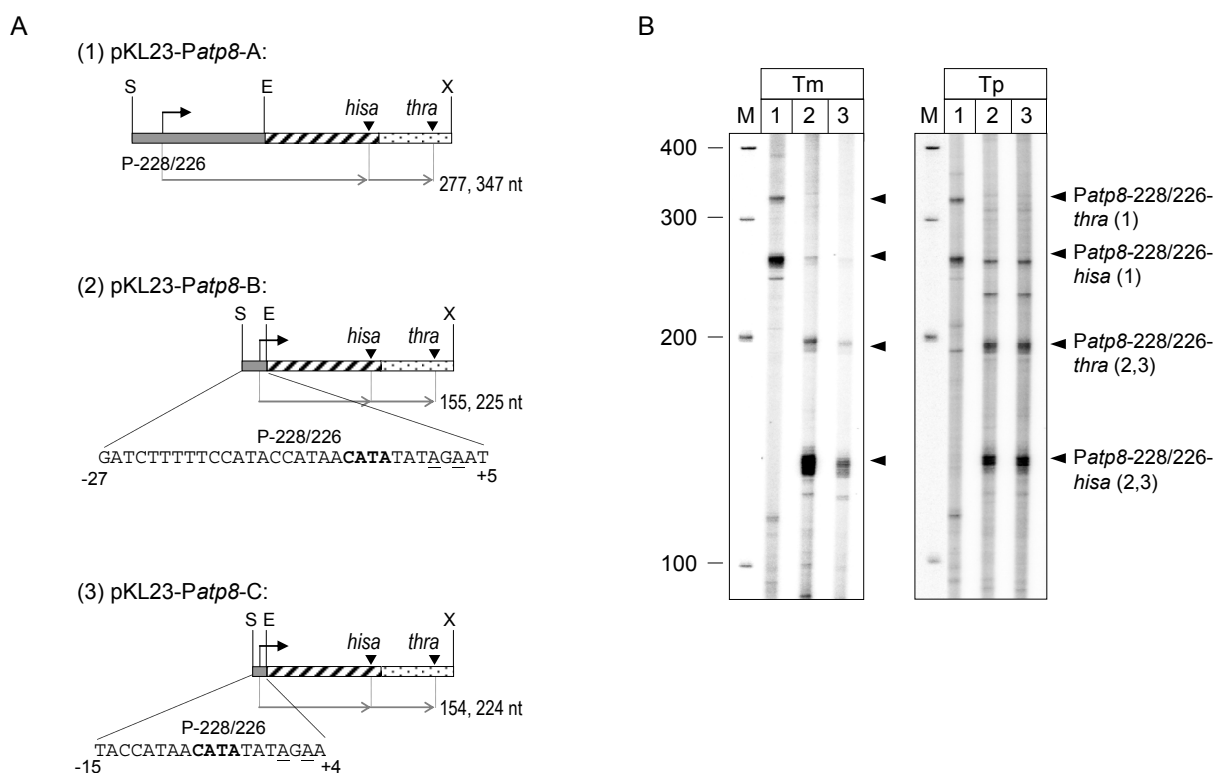
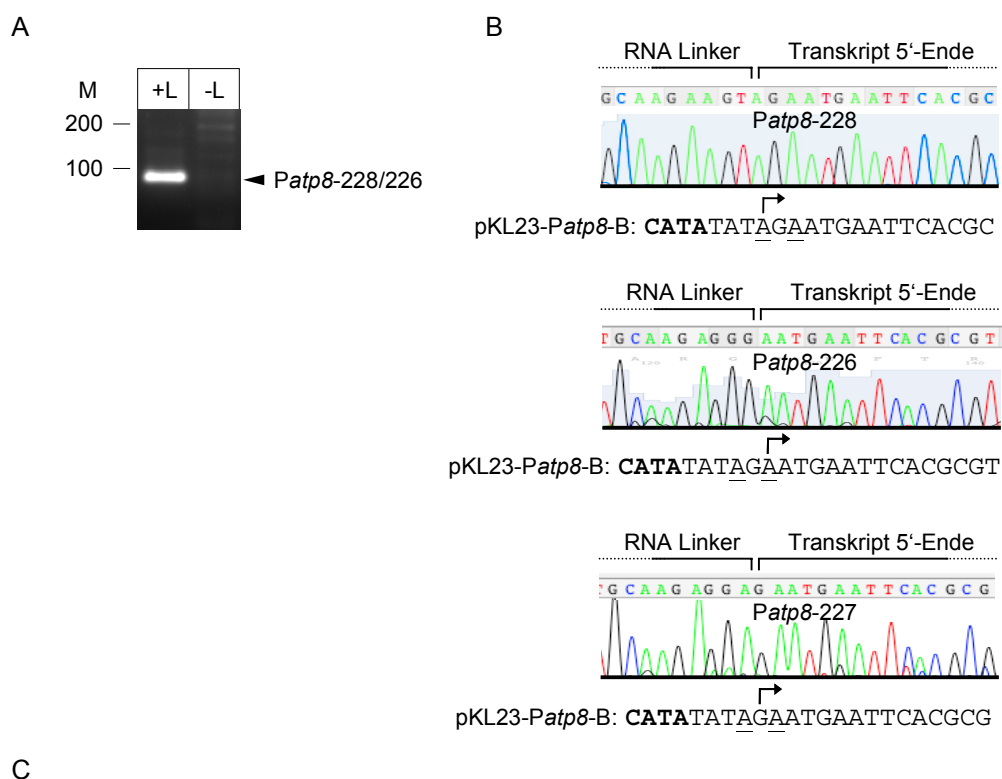


Abbildung 17: Deletionsanalyse des *Patp8*-228/226-Promotors zur Einschränkung des für die Transkriptionsinitiation essentiellen Bereichs. (A) Schematische Darstellung der Vektoren pKL23-*Patp8*-A (1), pKL23-*Patp8*-B (2) und pKL23-*Patp8*-C (3). Der Vektor pKL23-*Patp8*-A enthält eine 200 bp mt-DNA-Sequenz, die die Promotoren *Patp8*-228/226 und *Patp8*-157 enthält. Zur Vereinfachung wurde der *in vitro* nur durch 5'-RACE detektierbare Promotor *Patp8*-157 nicht dargestellt (vgl. Abbildung 9 B). Zur Konstruktion von pKL23-*Patp8*-B und pKL23-*Patp8*-C wurde die unterhalb der Vektoren gezeigte Promotorregion (Position -27 bis +5 bzw. -15 bis +4 bezogen auf eine Initiation an *Patp8*-228) über *SacI/EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Die erwarteten Transkripte bei Initiation an *Patp8*-228/226 gefolgt von einer Termination an *hisa* oder *thra* und entsprechende Transkriptlängen sind gekennzeichnet. Symbole wie in Abbildung 8 B. (B) RpoTm (Tm) und RpoTp (Tp) und wurden im *in vitro*-Assay auf promotorspezifische Transkription von den unter (A) dargestellten Vektoren (1-3) getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt und mit der dem eingesetzten Vektor entsprechenden Zahl (1-3) gekennzeichnet. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A.

Abbildung 17 A) und auf spezifische Erkennung durch RpoTm und RpoTp getestet (Abbildung 17 B).

Die Ergebnisse zeigen, dass RpoTm und RpoTp zur Transkription der verkürzten Promotorsequenzen in der Lage waren und somit die Sequenz von -15 bis +4 (bezogen auf den Transkriptionsstart) für diese Enzyme hinreichend für die Promotorerkennung ist. RpoTm zeigte allerdings eine um etwa 70 % reduzierte Menge spezifisch am Vektor pKL23-*Patp8*-C initiiert Transkripte verglichen mit dem Konstrukt pKL23-*Patp8*-B (Abbildung 17 B, Panel



Gen	Promotor	Sequenz	Anzahl sequenzierter Klone
<i>atp8</i>	<i>Patp8</i> -228/226	cataccataacatatatAGaatcga	4/7 (-228), 2/7 (-227), 1/7 (-226)

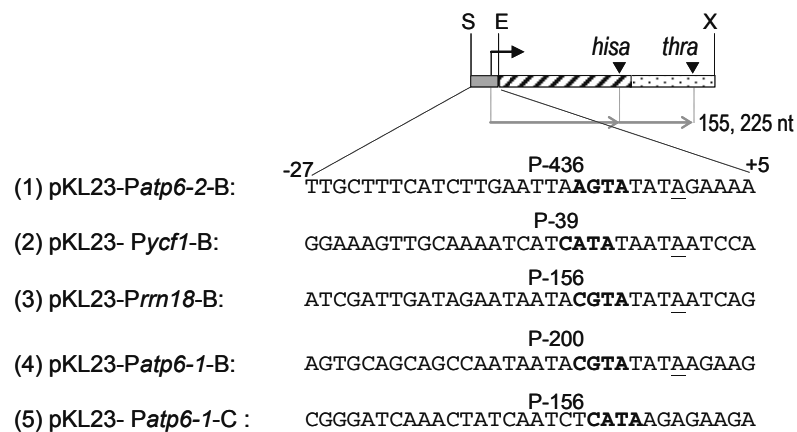
Abbildung 18: 5'-RACE der *in vitro* durch RpoTm synthetisierten RNA von zirkulärem pKL23-*Patp8*-B. (A) Transkripte mit einem ligierten 5'-RNA-Linker (+L) und als Kontrolle nicht-ligierte Transkripte (-L) wurden einer RT-PCR unterzogen. Analyse und Beschriftung wie in Abbildung 12 A. (B) Die Chromatogramme zeigen typische Sequenzen klonierter 5'-RACE-Produkte. Unterhalb der Chromatogramme ist der Promotor-beinhaltende Vektorbereich dargestellt. Beschriftung wie in Abbildung 12 B. (C) Anzahl der sequenzierten Klone sowie die Initiationshäufigkeit an den angegebenen Nukleotiden. *In vivo* detektierte Initiationsorte sind unterstrichen, *in vitro* bestimmte durch Großbuchstaben gekennzeichnet.

Tm, Konstrukte 2 und 3), was auf eine gewisse Relevanz bestimmter zwischen -27 und -15 liegender Nukleotide für die Effizienz der Transkription durch dieses Enzym hindeutet. RpoTp hingegen transkribierte die angebotenen Konstrukte etwa gleich effizient (Panel Tp, Konstrukte 2 und 3).

Die Signale für die erwarteten 154 bzw. 155 nt langen *Patp8-228/226-hisa* Transkripte der verkürzten Promotorkonstrukte zeigten sich in den Transkriptionsanalysen als multiple Banden (Abbildung 17, *Patp8-228/226-hisa*, Konstrukte 2 und 3). Um zu testen, ob es sich hierbei um Ungenauigkeiten bei der Initiation der Transkription aufgrund der verkürzten Promotorsequenzen handelt, wurden die 5'-Enden der durch RpoTm am pKL23-*Patp8-B*-Konstrukt synthetisierten RNAs durch 5'-RACE analysiert (Abbildung 18). Es zeigte sich, dass RpoTm auch dieses verkürzte Promotorkonstrukt meist exakt an dem *in vivo* detektierten Adenin an Position -228 initiierte (Abbildung 18 B, C). Interessanterweise konnte der zweite *in vivo*-Initiationsort an Position -226 nur für einen Klon nachgewiesen werden. Ein zusätzlicher Startpunkt, der für zwei Klone an der dazwischenliegenden Position -227 bestimmt wurde, deutet auf eine nur sehr leichte Initiationsungenauigkeit hin. Das Phänomen multipler P-*hisa*-Signale, scheint daher eher auf eine Termination an mehreren Nukleotiden in der A/T-reichen Terminatorregion des *hisa*-Attenuators oder auf eine mögliche Sekundärstrukturausbildung am Transkript-3'-Ende hinzuweisen.

Zur Überprüfung, ob Promotorsequenzen von -27 bis +5 ebenfalls für die spezifische und effiziente Transkription von Promotoren mit alternativen Architekturen ausreichen, wurden die entsprechenden Bereiche der Promotoren *Patp6-2-436*, *Prrn18-156*, *Patp6-1-200*, *Patp6-1-156* und *Pycf1-39*, *Pcox2-481* und *Patp9-487* in den pKL23-Vektor inseriert (Abbildung 19, Kap. 2.2.7.1.1) und im *in vitro*-Assay auf Transkription durch RpoTm und RpoTp untersucht (Abbildung 19 B). Die Ergebnisse zeigten, dass für die meisten Promotoren die Sequenz von -27 bis +5 für eine spezifische Erkennung durch RpoTm und RpoTp ausreichte. Während RpoTm die meisten der angebotenen Promotoren erkannte (Abbildung 19 B, Panel RpoTm) war die Transkription des bereits zuvor durch RpoTp schlecht erkannten *Prrn18-156*-Promotors (vgl. Abbildung 9) kaum noch detektierbar (Panel RpoTp, Konstrukt 3). Eine ähnlich ineffiziente Transkription wurde sowohl für RpoTm als auch für RpoTp bei Angebot der zuvor ebenfalls lediglich schwach transkribierten Promotoren *Pcox2-481* und *Patp9-487* Promotoren beobachtet (Daten nicht gezeigt, vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10). Hervorzuheben ist die deutliche Transkription vom Promotor *Patp6-1-156* durch RpoTm (Abbildung 19 B, Konstrukt 5), dessen Erkennung zuvor auf Konstrukten, die zusätzlich den Promotor *Patp6-1-200* enthielten, nicht detektiert werden konnte.

A



B

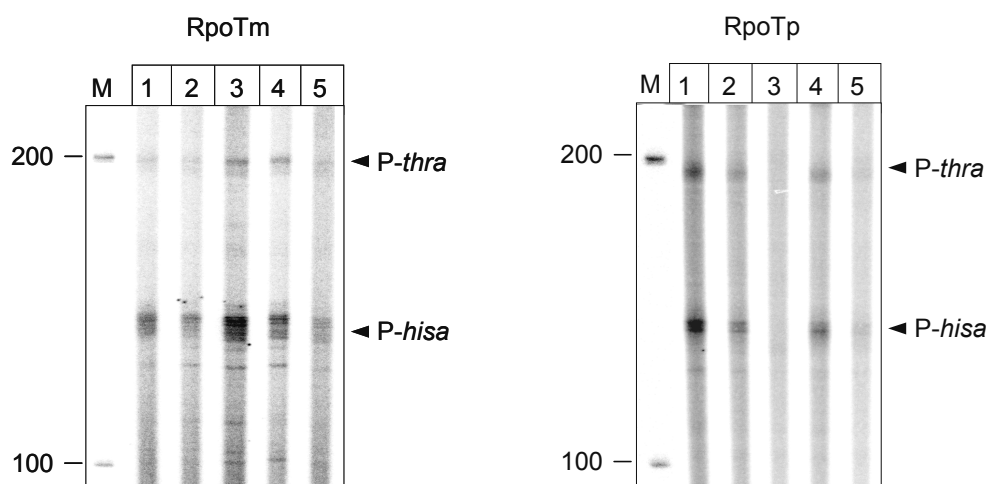


Abbildung 19: Die Promotorregion von -27 bis +5 ist meist ausreichend für eine spezifische Erkennung durch RpoTm und RpoTp. (A) Zur Konstruktion von pKL23-*Patp6*-2-B (1), pKL23-*Pycf1*-B (2), pKL23-*Prm18*-B (3), pKL23-*Patp6*-1-B (4) und pKL23-*Patp6*-1-C (5) wurden die unterhalb des Vektorbereichs gezeigten Promotorregionen (Position -27 bis +5, bezogen auf eine Initiation an den dargestellten Promotoren) über *SacI*/*EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Promotorkernsequenzen sind fett geschrieben, *in vivo* detektierte Transkriptionsinitiationsorte unterstrichen. Die erwarteten Transkriptlängen sind gekennzeichnet. Symbole wie in Abbildung 8 B. (B) RpoTm und RpoTp wurden auf promotorspezifische Transkription von den unter (A) dargestellten Vektoren (1-5) getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A.

3.1.5.2 RpoTm und RpoTp erkennen ein konserviertes Promotorkernelement

Die *in vitro*-Transkriptionsassays in den vorangegangenen Kapiteln präsentieren eine intrinsische Fähigkeit von RpoTm und RpoTp zur Initiation der Transkription an diversen Promotoren. Weitere Experimente sollten zeigen, wie wichtig das in vielen mitochondrialen und plastidären NEP-Promotoren vorkommende YRTA-Motiv für die Promotorerkennung durch die RpoT-Polymerasen ist.

Der mitochondriale *Patp8*-228/226-Promotor besitzt eine solche YRTA-Kernsequenz (CATA) und wurde aufgrund der guten Erkennung durch RpoTm und RpoTp in den vorangegangenen Experimenten (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 17) für eine Punktmutationsanalyse ausgewählt (Abbildung 20). Hierzu wurde das CATA-Motiv des WT-Promotors durch die Sequenzen acTA, CtgA oder CAcc ersetzt und die Sequenzen in den pKL23-Vektor inseriert (Abbildung 20 B). Es konnte zuvor gezeigt werden, dass die Substitution dieser Nukleotide in der CATA-Kernsequenz des plastidären *rpoB*-Promotors einen starken negativen Effekt auf dessen Erkennung durch Tabak-Chloroplasten-Extrakte in *in vitro*-Studien hatte [Liere und Maliga, 1999].

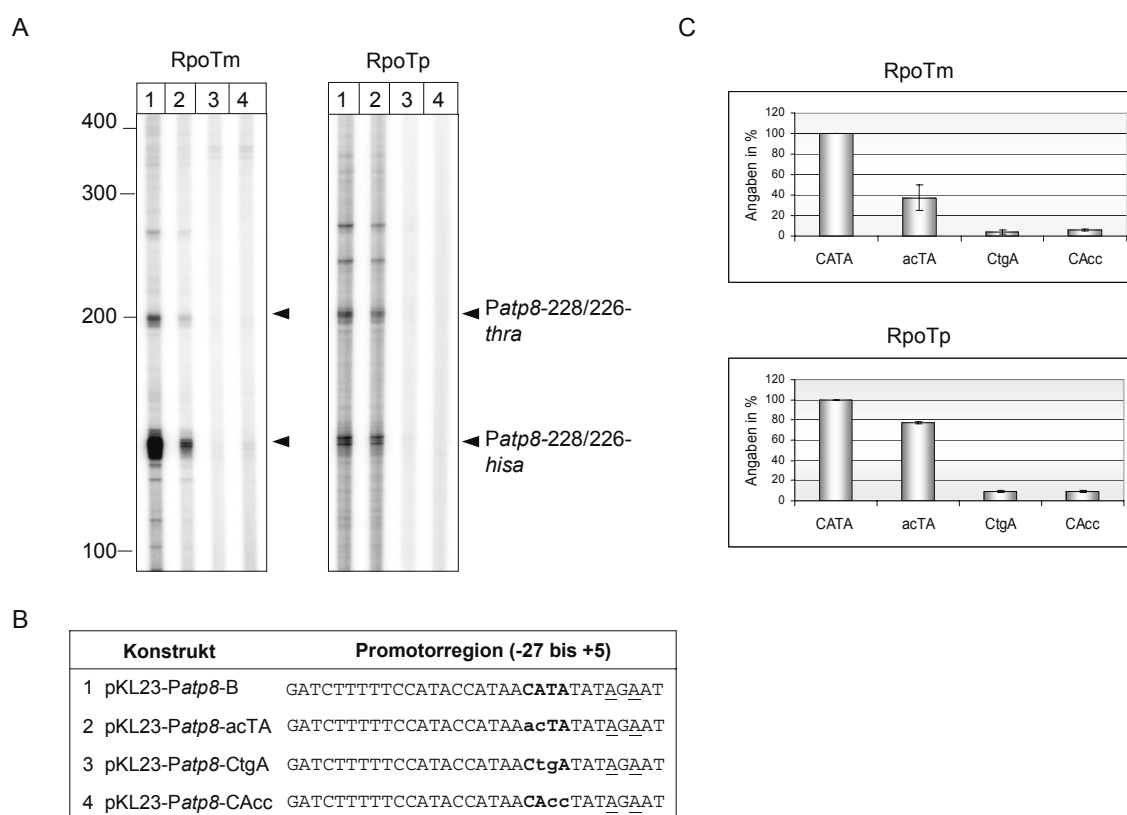


Abbildung 20: Punktmutationsanalyse des mitochondrialen *Patp8*-228/226-Promotors. (A) RpoTm und RpoTp (je 900 fmol) wurden auf promotorspezifische Transkription von je 200 ng der superheli-kalen Vektoren pKL23-*Patp8*-B (1, vgl. Abbildung 17 A), pKL23-*Patp8*-acTA (2), pKL23-*Patp8*-CtgA (3) und pKL23-*Patp8*-CAcc (4) getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. (B) Zur Konstruktion der unter (A) untersuchten Vektoren wurden die gezeigten Promotorregionen (Position -27 bis +5, bezogen auf die Transkriptionsinitiation an *Patp8*-228) über *SacI/EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. *In vivo*-Transkriptionsinitiationsorte sind unterstrichen, Promotorkernsequenzen fett gedruckt. Die in den Versionen 2-4 mutagenisierten Nukleotide sind klein geschrieben. (C) Quantifizierung der durch RpoTm und RpoTp synthetisierten RNA-Transkripte in Abhängigkeit von den angebotenen Promotormatrizen. Die Promotorkernsequenzen sind angezeigt. Die Transkriptmenge durch Initiation am Wildtyp-Promotor (CATA) wurde auf 100% gesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen durchge-führt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

Die WT- und mutagenisierten Promotorversionen wurden in *in vitro*-Experimenten auf spezifische Erkennung durch RpoTm und RpoTp untersucht. Die Transkription der mutagenisierten Promotoren zeigte z. T. drastisch reduzierte Mengen der durch RpoTm und RpoTp spezifisch synthetisierten RNAs (Abbildung 20 A, Spuren 3 und 4). Für die Promotoren mit einer CtgA oder CAcc-Kernsequenz sank die Menge spezifischer Transkripte auf unter 10% der am WT-Promotor synthetisierten RNA-Menge (Abbildung 20 C), was die Wichtigkeit des YRTA-Motivs für die Promotorerkennung durch die rekombinanten Enzyme verdeutlicht.

Die Bestimmung von Transkriptionsinitiationsorten im mitochondrialen Genom von *Arabidopsis* führte zu Identifizierung von Promotorkernsequenzen, die sich vom bislang bekannten YRTA-Motiv unterscheiden [Kap. 1.2.3.2, Kühn, 2005]. Um zu testen, ob diese abweichenden Kernsequenzen ähnlich essentiell für die Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation sind, wurde das mehrfach stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle auftretende Sequenzmotiv AGTA für weitere Mutationsanalysen ausgewählt (Abbildung 21). Der Promotor *Patp6-2-436* weist eine solche potentielle Kernsequenz auf, die durch Mutagenese zu ccTA, AccA oder AGat geändert wurde. Um zu testen, inwieweit die Effizienz der Promotorerkennung von einer möglichst hohen Übereinstimmung mit der YRTA-Standardsequenz abhängt, wurde zusätzlich mit der Mutationsvariante cGTA ein typisches YRTA-Motiv hergestellt (Abbildung 21 B). Die WT- und mutagenisierten Promotorversionen wurden wiederum in *in vitro*-Transkriptionsexperimenten auf spezifische Erkennung durch RpoTm und RpoTp untersucht (Abbildung 21 A). Im Gegensatz zur reduzierten Transkription am mutagenisierten YRTA-Motiv des *Patp8-228/226*-Promotors (s. o.) konnte für die meisten der Promotorvarianten des *Patp6-2-436*-Promotors eine unveränderte bis leicht (ccTA, AccA) oder deutlich verstärkte (cGTA) Transkriptionsinitiation durch RpoTm und RpoTp beobachtet werden (Abbildung 21 A, Spuren 2, 3 und 5; C). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden RNAPs wurde lediglich im Falle der AGat-Promotorversion gesehen, die im Vergleich zur Transkription des WT-Promotors durch RpoTm zu einer wesentlich höheren, im Fall von RpoTp zu einer deutlich reduzierten RNA-Synthese führte (Abbildung 21 A, Spuren 4; C). Die bei der Mutagenese des *Patp8-228/226*-Promotors gesehene Bedeutung des YRTA-Motivs für eine hohe Effizienz der Promotor-Transkription spiegelt sich auch in den hier durchgeführten Versuchen wider, da die Herstellung eines solchen Motivs in der Kernsequenz des *Patp6-2-436*-Promotors dessen Transkription signifikant verstärkte (Abbildung 21 A, Spuren 5; C). Das AGTA-Kernmotiv scheint dagegen eine weniger wichtige Rolle in der Erkennung durch die rekombinanten Enzyme zu spielen.

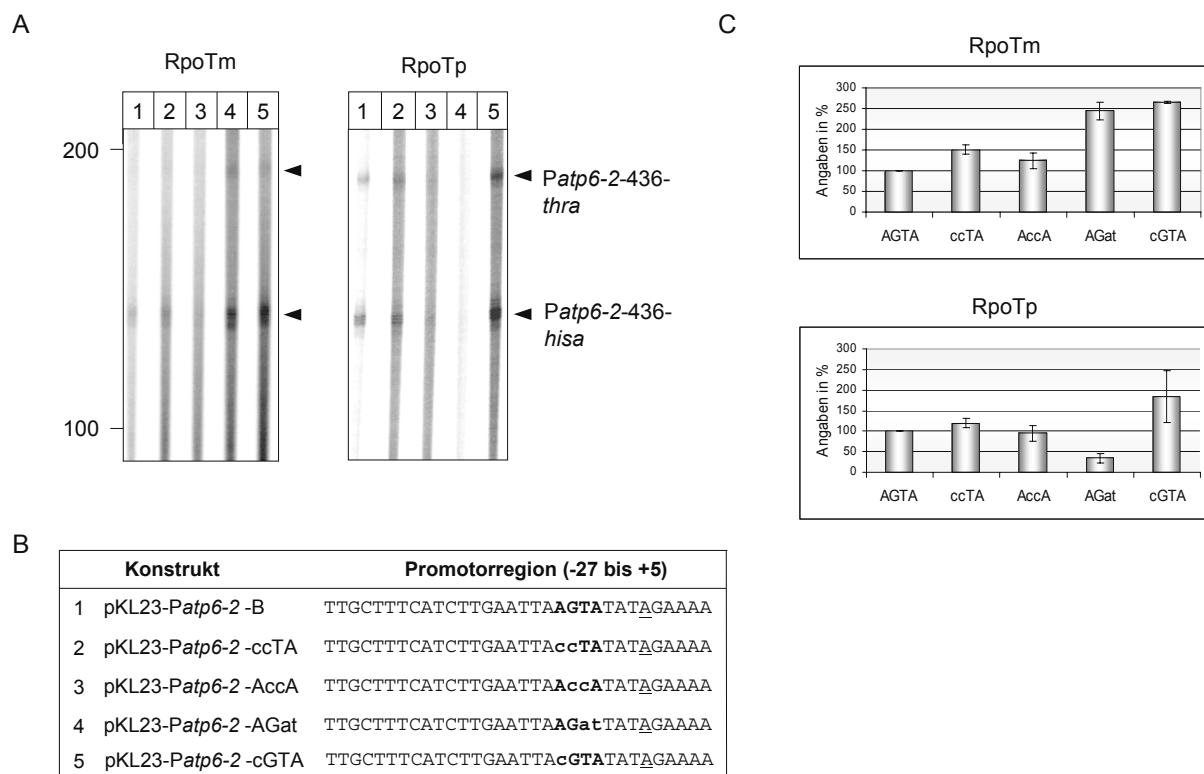


Abbildung 21: Punktmutationsanalyse des mitochondrialen *Patp6-2-436*-Promotors. (A) RpoTm und RpoTp (je 900 fmol) wurden auf promotorspezifische Transkription von den superhelikalen Vektoren pKL23-*Patp6-2* (1), pKL23-*Patp6-2*-ccTA (2), pKL23-*Patp6-2*-AccA (3), pKL23-*Patp6-2*-AGat (4) und pKL23-*Patp6-2*-cGTA (5) getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. (B) Zur Konstruktion der unter (A) untersuchten Vektoren wurden die gezeigten Promotorregionen (Position -27 bis +5, bezogen auf die Transkriptionsinitiation an *Patp6-436*) über *SacI*/*EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Darstellung wie in Abbildung 20. (C) Quantifizierung der durch RpoTm und RpoTp synthetisierten RNA-Transkripte in Abhängigkeit von den angebotenen Promotormatrizen. Die Promotorkernsequenzen sind angezeigt. Die Transkriptmenge durch Initiation am Wildtyp-Promotor (AGTA) wurde auf 100% gesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

Obwohl die Mutagenese der *Patp8-228/226* und *Patp6-2-436*-Promotoren zeigte, dass ein möglichst konserviertes YRTA-Motiv eine bedeutende Rolle für die Transkriptionsinitiation spielt, ist dieses Motiv alleine nicht hinreichend für die Promotorerkennung, da einige organelläre Promotoren, die dieses Motiv aufweisen *in vitro* nicht durch die rekombinanten RpoTs erkannt werden. Andererseits werden auch Promotoren, die dieses Motiv nicht beinhalten *in vitro* transkribiert, wenn auch meist mit geringerer Effizienz. Eine zwischen der Kernsequenz und Initiationsort liegende TAT-Sequenz, könnte neben dem YRTA-Kernmotiv ein weiteres, für eine effektive Promotorerkennung wichtiges Sequenzmotiv sein, da sie in nahezu allen *in vitro* durch RpoTm und RpoTp erkannten Promotoren vorkommt (vgl. Tabelle 13). Schlech-

ter oder nicht erkannte Promotoren, wie beispielsweise der *Patp6-1-156*, *Patp8-157*, *Patp9-239* oder *Prrn18-69*-Promotor besitzen dagegen an gleicher Stelle eine AGA-Sequenz (vgl. Tabelle 13). Welche Rolle diesen Motiven bei der Erkennung tatsächlich zukommt, sollte durch *in vitro*-Transkriptionsanalysen mit chimären Promotoren erhellt werden. Für die Mutageneseexperimente wurde zum einen der effizient erkannte *Patp8-228/226*-Promotor ausgewählt, der die genannte TAT-Sequenz beinhaltet, zum anderen der schlecht erkannte *Patp6-1-156*-Promotor, der zwar ebenso eine YRTA-Kernsequenz besitzt, jedoch stromaufwärts des Initiationsortes eine AGA-Sequenz aufweist (Abbildung 22 und Abbildung 23). Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der *in vitro*-Transkription des *Patp8-228/226*-WT-Promotors (Konstrukt 1) und seiner mutagenisierten Varianten, die im Bereich des TAT-

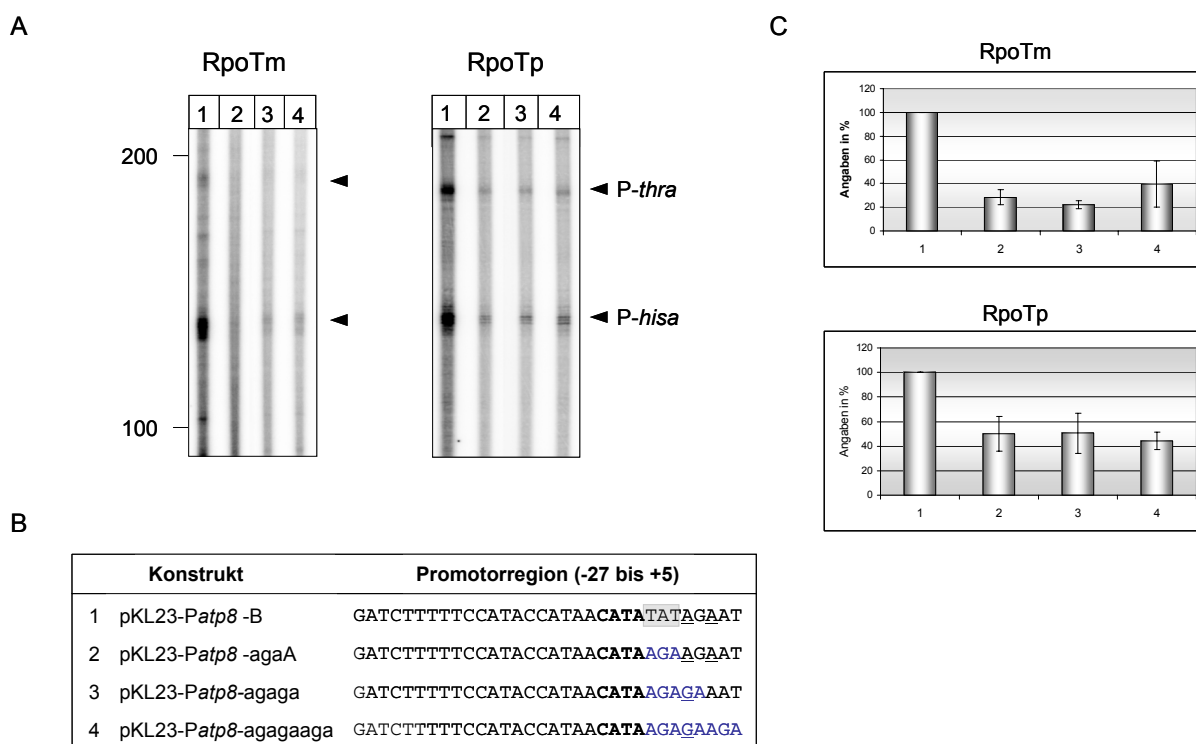


Abbildung 22: Mutationsanalyse des TAT-Motivs des mitochondrialen *Patp8-228/226*-Promotors. (A) RpoTm und RpoTp (je 900 fmol) und wurden auf promotorspezifische Transkription von den superhelikalen Vektoren pKL23-*Patp8*-B (1), pKL23-*Patp8*-agaA (2), pKL23-*Patp8*-agaga (3) und pKL23-*Patp8*-agagaaga (4) getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. (B) Zur Konstruktion der unter (A) untersuchten Vektoren wurden die gezeigten Promotorregionen (Position -27 bis +5, bezogen auf die Transkriptionsinitiation an *Patp8-228*) über *SacI/EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Die Promotorkernsequenz ist fett gedruckt, das durch Mutagenese veränderte TAT-Motiv ist grau hervorgehoben. Ausgetauschte Nukleotide, die an diesen Positionen denen des *Patp6-1-156*-Promotors entsprechen (vgl. Abbildung 23), sind in dunkelblau angezeigt. (C) Quantifizierung der durch RpoTm und RpoTp synthetisierten RNA-Transkripte in Abhängigkeit von den angebotenen Promotormatrizen (1-4). Die Transkriptmenge durch Initiation am Wildtyp-Promotor wurde auf 100% gesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

Motivs und über die Transkriptionsinitiationsstelle hinausgehende, verschieden lange Elemente des *Patp6-1-156*-Promotors aufweisen (Konstrukte 2-4). Die Synthese spezifischer RNAs an allen der angebotenen chimären Promotorversionen durch RpoTm und RpoTp war im Vergleich zu der am WT-Promotor deutlich reduziert. Die Mutagenese des TAT-Motivs führte im Fall von RpoTm zu einer um etwa 60-80% geringeren Transkriptionseffizienz, wogegen die durch RpoTp synthetisierten RNA-Mengen noch bei etwa 50% des WT-Promotorniveaus lagen (Abbildung 22 C).

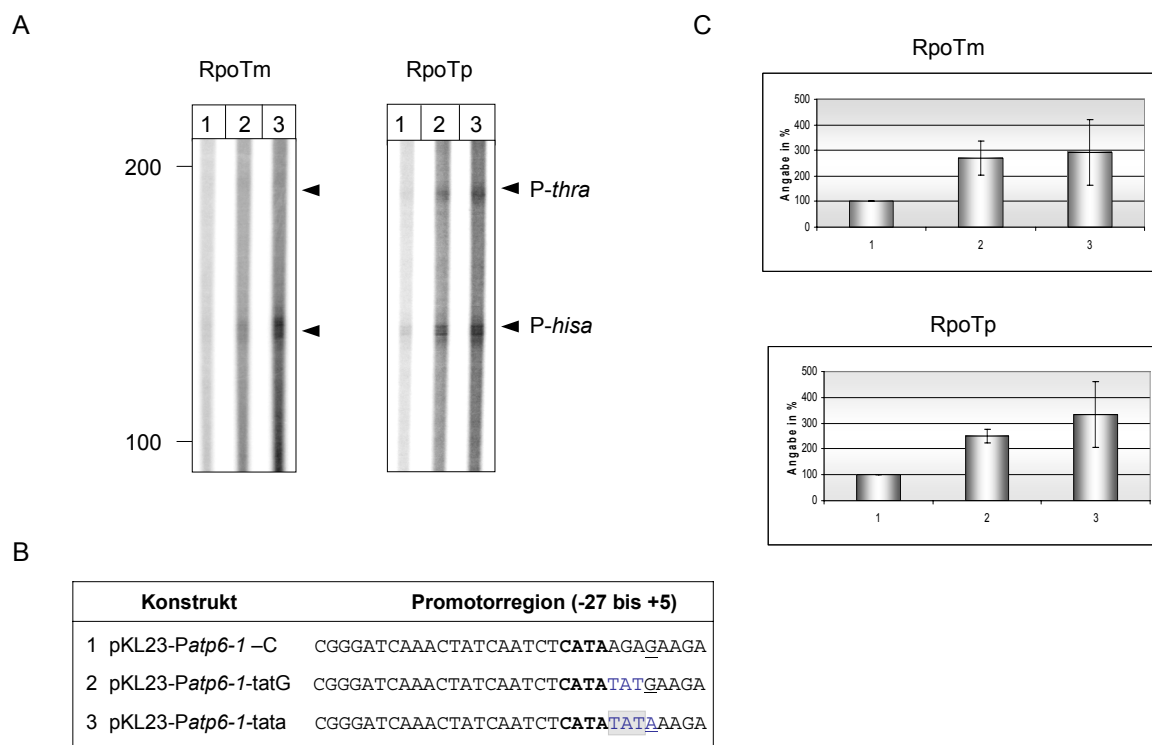


Abbildung 23: Mutationsanalyse des mitochondrialen *Patp6-1-156*-Promotors. (A) RpoTm und RpoTp (je 900 fmol) und wurden auf promotorspezifische Transkription von den superhelikalen Vektoren pKL23-*Patp6-1*-C (1), pKL23-*Patp6-1*-tatG (2) und pKL23-*Patp6-1*-tata (3) getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. (B) Zur Konstruktion der unter (A) untersuchten Vektoren wurden die gezeigten Promotorregionen (Position -27 bis +5, bezogen auf die Transkriptionsinitiation an *Patp6-1-156*) über *SacI/EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Darstellung wie in Abbildung 22. Das durch Mutagenese erzeugte TAT-Motiv ist grau hervorgehoben. (C) Quantifizierung der durch RpoTm und RpoTp synthetisierten RNA-Transkripte in Abhängigkeit von den angebotenen Promotor-Matrizen (1-3). Die Transkriptmenge durch Initiation am Wildtyp-Promotor (1) wurde auf 100% gesetzt. Für RpoTm wurden Doppelbestimmungen, für RpoTp Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

Entsprechend der Mutagenese des TAT-Motivs wurde das AGA-Motiv des *Patp6-1-156*-Promotors durch Elemente des *Patp8-228/226*-Promotors ersetzt und die Promotorkonstrukte durch RpoTm und RpoTp *in vitro* transkribiert (Abbildung 23). Das Ersetzen des AGA-Motivs durch TAT stimulierte die Transkription durch beide Enzyme an diesem Promotor etwa um das 2,5-fache (Abbildung 23 A, Spur 2; C). Dieser Effekt wurde durch eine zusätzliche Substitution des Initiationsnukleotids des *Patp6-1-156*-Promotors von G nach A sogar noch verstärkt (Spur 3; C). Die Analysen der chimären Promotoren weisen somit eindrucksvoll auf die Wichtigkeit der Nukleotide in der Region zwischen Promotorkernsequenz und Initiationsort für eine effiziente Transkriptionsinitiation durch RpoTm und RpoTp hin.

3.1.6 Abhängigkeit der Promotorerkennung von der DNA-Konformation

Das Chromosom von *E. coli* ist ein zirkuläres Molekül, das in einem negativ-superhelikalen Zustand vorliegt. Diese superhelikale Konformation erzeugt eine Torsionsspannung in der DNA, wodurch Prozesse, die eine DNA-Aufschmelzung erfordern, wie z. B. die Replikationsinitiation [Funnell et al., 1987] oder Transkription [Hatfield und Benham, 2002; Peter et al., 2004; Wang und Lynch, 1996] beeinflusst werden können. Die Transkription organellärer RNA- und proteinkodierender Gene ist möglicherweise ebenfalls abhängig von der DNA-Konformation. In Pflanzen existieren bislang nur wenige Daten über den Einfluss der DNA-Konformation der organellären Genome auf die mitochondriale und plastidäre Genexpression (vgl. Kap. 1.2.5).

Hinweise auf eine DNA-konformationsabhängige Transkription organellärer Gene durch die Phagentyp-RNA-Polymerasen zeigten bereits die vorangegangenen *in vitro*-Experimente, in denen lediglich zirkulär-superhelikale, nicht aber lineare DNA-Matrizen von den rekombinanten Enzymen RpoTm und RpoTp spezifisch transkribiert wurden (Kap. 3.1.2, 3.1.3). Auch das rekombinante Enzym RpoTmp wies eine deutlich höhere transkriptionelle Aktivität an zirkulär-superhelikalen Matrizen auf.

Um einen genaueren Einblick in die DNA-konformationsabhängige Transkription durch die Phagentyp-RNAPs zu bekommen, wurden weitere *in vitro* Experimente durchgeführt. Es sollte hierbei gezeigt werden, inwieweit die spezifische und effiziente Transkription vom Angebot einer zirkulär-superhelikalen Matriz e abhängig bzw. ob eine zirkulär-entspannte Konformation des Plasmids hinreichend ist. Zur Relaxierung eingesetzter Promotorplasmide wurde Topoisomerase I verwendet. Dieses Enzym induziert transiente DNA-Einzelstrangbrüche, wodurch es zu einer Entfernung negativer Windungen und somit zur Entspannung des DNA-Moleküls kommt [Übersicht in Champoux, 2001]. Die Behandlung des Vektors pKL23-

Patp8-A mit Topoisomerase I führte zu mehreren relaxierten Zustandsformen des Plasmids (Abbildung 24, „rel“).

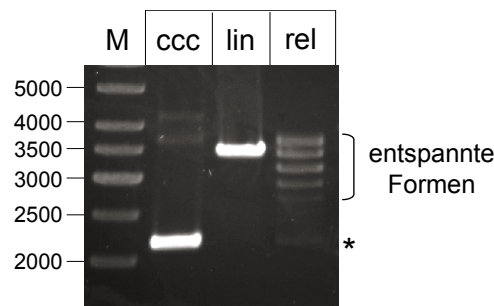


Abbildung 24: Illustration verschiedener in die *in vitro*-Transkription eingesetzter DNA-Konformationen des Vektors pKL23-*Patp8*-A. Es wurden jeweils 0,25 µg zirkulär-superhelikale (ccc), *Xho*I-linearisierte (lin) oder durch Topoisomerase I zirkulär-entspannte (rel) Plasmid-DNA durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert. M: DNA-Längenstandard (bp). Die Migrationspositionen entspannter DNA-Formen sind angezeigt. Das Sternchen zeigt geringe Mengen mitgeführter superhelikaler DNA in der Spur „rel“ an.

Die spezifische RNA-Synthese von zirkulär-entspannten Promotorkonstrukten durch RpoTm und RpoTp wurde in einem vergleichenden *in vitro*-Assay parallel zur Transkription von zirkulär-superhelikalen und linearen Matrizen untersucht (Abbildung 25). Es zeigte sich, dass die Transkription sowohl durch RpoTm als auch durch RpoTp bei Angebot eines relaxierten Promotorkonstruktes im Vergleich zur RNA-Synthese an superhelikalen Matrizen drastisch reduziert war (Spuren 2). Auch das Enzym RpoTmp zeigte bei Angebot von relaxierten Plasmiden im Vergleich zu superhelikalen eine deutliche Reduktion der transkriptionellen Aktivität (Daten nicht gezeigt). Entsprechend den Experimenten mit Topoisomerase-behandeltem pKL23-*Patp8*-A-Vektor wurden die Plasmide pKL23-*PtrnM* und pKL23-*Patp6-2* auf konformationsabhängige Transkription durch RpoTm und RpoTp untersucht, was zu ähnlichen Ergebnissen führte (Daten nicht gezeigt). Demnach scheint eine superhelikale DNA-Konformation *in vitro* unter den genutzten Bedingungen eine Voraussetzung für eine effiziente Transkription zu sein. Eine geringe Rest-Transkription des relaxierten Plasmids könnte durch methodisch-bedingt nicht-abgetrennte zirkulär-superhelikale Matrizen (siehe Abbildung 24, Sternchen) hervorgerufen worden sein.

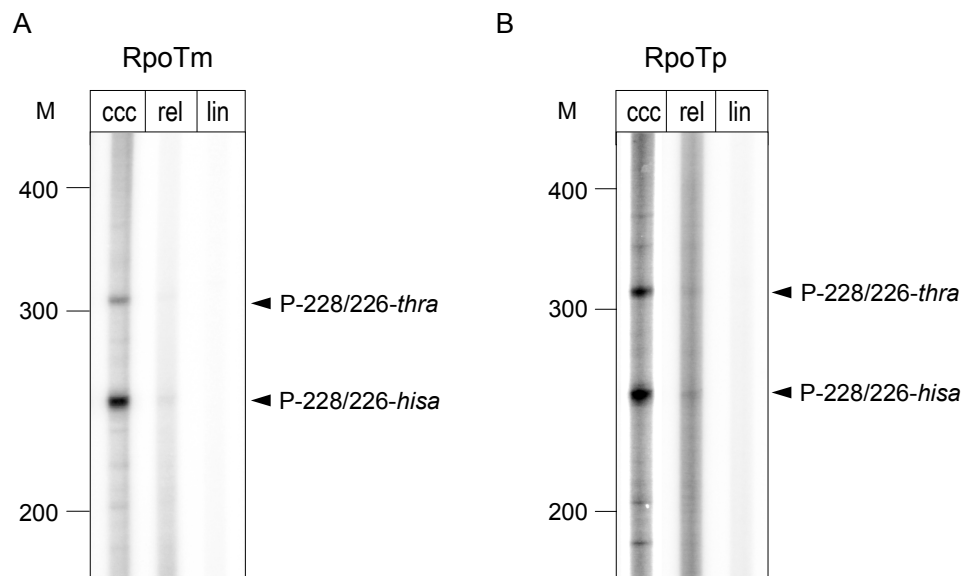


Abbildung 25: DNA-konformationsabhängige *in vitro*-Transkription des pKL23-Patp8-A-Vektors durch RpoTm (A) und RpoTp (B). Es wurden jeweils 200 ng zirkulär-superhelikaler (ccc), zirkulär-entspannter (rel) oder linearer (lin) Plasmid-DNA angeboten (vgl. Abbildung 24). Distinkte RNA-Produkte sind durch Pfeile gekennzeichnet und korrespondieren mit einer Transkriptionsinitiation am Promotor Patp8-228/226 gefolgt von einer Termination an *hisa* und/oder *thra*. Erwartete Transkriptgrößen und Beschriftung wie in Abbildung 9.

3.1.7 In vitro-Transkription linearer DNA-Matrizen an aufgeschmolzenen Promotorsequenzen

Die rekombinanten Enzyme RpoTm, RpoTp und RpoTmp zeigten in den vorangegangenen Experimenten eine starke Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivität von der DNA-Konformation (Kap. 3.1.2, 3.1.3, 3.1.6). Bislang war es nicht möglich *in vitro* eine Transkription linearer DNA-Matrizen durch die rekombinanten RNA-Polymerasen nachzuweisen. Im Gegensatz dazu zeigten zumindest RpoTm und RpoTp eine intrinsische Fähigkeit viele, wenn auch nicht alle, der angebotenen Promotoren zu transkribieren, wenn sich diese auf superhelikalen Promotormatrizen befanden (vgl. Kap. 3.1.2, 3.1.3). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass *in vivo* zusätzliche Proteine an der Aufschmelzung der DNA und möglicherweise an der Promotorerkennung beteiligt sind.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten lineare DNA-Matrizen mit einer durch Nukleotidmisspaarung erzeugten DNA-Aufschmelzung im Promotorbereich (Misspaarung von -4 bis +2 bezogen auf den Transkriptionsstart) *in vitro* transkribiert werden (Abbildung 26). Die Transkription von vorausgeschmolzenen (*bubble*) Matrizen wurde mit der von linearen Matrizen gleicher Länge, die entweder den mitochondrialen Patp8-228/226- oder Patp9-239-

Promotor enthielten, verglichen. Als Kontrolle diente eine auf der *Patp9*-239-Promotorregion basierende voraufgeschmolzene Matrize, in der die Promotorkernsequenz beinhaltende Region von -5 bis +4 in beiden Strängen durch nicht komplementäre zufällige Nukleotide ersetzt wurde (Abbildung 26 A).

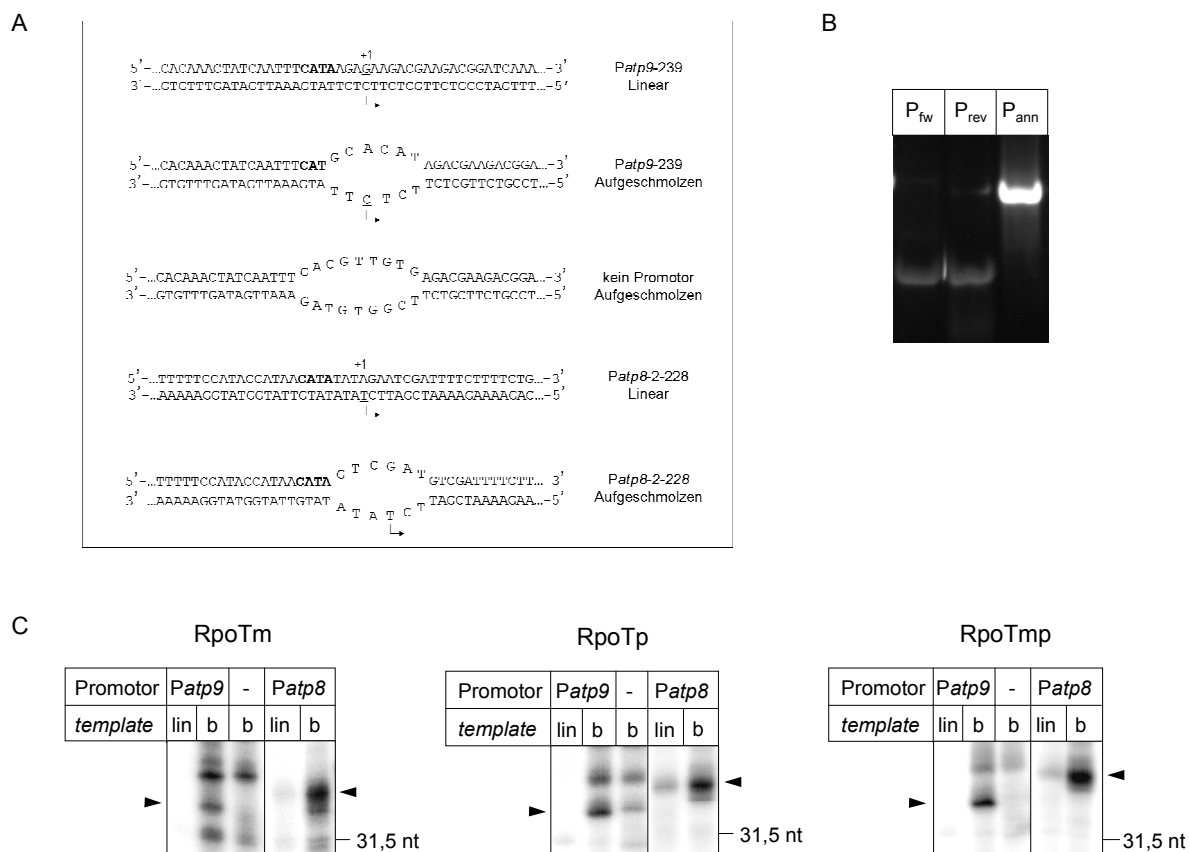


Abbildung 26: *In vitro*-Transkription aufgeschmolzener Promotormatrizen. (A) Die Synthese linearer und linear-aufgeschmolzener Matrizen erfolgte durch *annealing* komplementärer 70 bp-Oligonukleotide (Kap. 2.2.7.1.2). Dargestellt sind die *annealing*-Produkte der *Patp9*-239 und *Patp8*-228/226 Promotorregion. Zur Generierung sog. *bubbles* wurden in den nicht-codogenen Strang nicht-komplementäre Basen eingefügt (Misspaarung von -2 bis +4 bzw. -3 bis +3 bezogen auf die *in vivo* detektierte Transkriptionsinitiation an *Patp9*-239 und *Patp8*-228). Als Kontrolle diente ein aufgeschmolzenes *template* ohne Promotorsequenz (siehe Text). (B) Die Effizienz des *primer annealing*s wurde durch native Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 2.2.3.2.4) überprüft. Beispielhaft gezeigt ist die Analyse der für die Synthese der linearen *Patp8*-228-Matrize verwendeten Oligonukleotide (je 100 pmol). P_{fw}: Fw-Einzelstrangoligonukleotid; P_{rev}: Rev-Einzelstrangoligonukleotid; P_{ann}: P_{fw} und P_{rev} nach der *annealing*-Reaktion. (C) *In vitro*-Transkription der unter (A) dargestellten Promotormatrizen durch je 900 fmol RpoTm, RpoTm und RpoTp (Kap. 2.2.7.3). Die Matrizen (je 5 ng) wurden in linearer (lin) oder linear-aufgeschmolzener (b, *bubble*) Form angeboten. Bei korrekter Transkriptionsinitiation am *Patp9*- bzw. *Patp8*-Promotor entspricht die erwartete Transkriptlänge 37 nt. Parallel wurde ein endmarkiertes 31 nt-Oligonukleotid als Längenstandard mitgeführt. Spezifische RNA-Produkte sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Transkriptanalyse erfolgte in 20%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen (Kap. 2.2.3.2.3).

Es zeigte sich, dass bei Angebot der voraufgeschmolzenen Promotormatrize *Patp8-228/226* alle drei RpoTs in der Lage waren den Promotor zu transkribieren (Abbildung 26 C). Besonders hervorzuheben ist hierbei die Transkription durch das Enzym RpoTmp, das zuvor keine Erkennung dieses Promotors zeigte (vgl. Kap. 3.1.2). Die bei der Transkription der linearen *Patp8-228/226* Promotormatrize gesehene, geringe Menge spezifischer Produkte beruht wahrscheinlich auf der Transkription nicht-abgetrennter Einzelstrangoligonukleotide, da zuvor keine Transkription linearer Matrizen detektierbar war (vgl. Kap. 3.1.2, 3.1.3). Zudem lieferte die Transkription bei Verwendung einzelsträngiger Oligonukleotide als Matrize in einigen Fällen ebenfalls Produkte gleicher Größe, deren Abundanz jedoch deutlich niedriger war als bei der Transkription von doppelsträngigen Oligonukleotiden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zur spezifischen Erkennung des *Patp8-228/226*-Promotors zeigte sich bei Angebot des bislang *in vitro* nicht erkannten *Patp9-239* Promotors eine mehrfache Transkriptionsinitiation innerhalb der Promotorblase. Produkte gleicher Größe konnten z. T. auch bei der Transkription der auf der *Patp9*-Region basierenden Nicht-Promotormatrize gesehen werden, wogegen keine der RNAPs das lineare *template* transkribierte (Abbildung 26 C).

Das RNA-Dimethyltransferase-ähnliche Protein MetA (At5g66360) kommt durch seine Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren der Mitochondrien-RNA-Polymerasen aus Hefe und Mensch (mtTFB, vgl. Kap. 1.2.4.2) als Transkriptionsfaktor für die hier untersuchten mitochondrialen RNAPs in Frage. MetA zeigte *in vitro* bislang keinen Einfluss auf die Transkription mitochondrialer Promotoren durch RpoTm oder RpoTmp [Kühn, 2005]. Dies könnte jedoch im Fehlen eines für die DNA-Aufschmelzung benötigten Faktors begründet sein, so dass der Einfluss von rekombinantem MetA Protein auf die Transkription an den beschriebenen voraufgeschmolzenen linearen Matrizen untersucht werden sollte. Matsunaga und Jaehning [2004] beobachteten in *in vitro*-Transkriptionen durch die mitochondriale RNAP Rpo41 aus Hefe an voraufgeschmolzenen Promotormatrizen bei Addition von sc-mtTFB einen inhibitorischen Effekt auf die Transkription, da es zur Zunahme abortiver Transkripte kam. Daher wurden die voraufgeschmolzenen Promotoren *Patp8* und *Patp9* (s. o.) auf einen möglichen Einfluss von MetA auf die Transkription dieser Konstrukte durch RpoTm hin untersucht. Die Zugabe von äquimolaren Mengen MetA zeigte jedoch keinen Effekt auf die Transkription der angebotenen Promotoren (Daten nicht gezeigt). Auch die von Matsunaga und Jaehning [2004] beobachtete Zunahme abortiver Transkripte konnte nicht detektiert werden.

3.1.8 Unveränderte Promotorspezifität hochaufgereinigter rekombinanter Phagentyp-RNA-Polymerasen

Die in den bisher beschriebenen Experimenten verwendeten, über Ni^{2+} -NTA-Agarose aufgereinigten RNAP-Präparationen zeigten zwar eine deutliche Anreicherung der rekombinanten Enzyme, wiesen jedoch auch zahlreiche zusätzliche Proteinbanden auf (Abbildung 27 A, Spuren „Ni“; vgl. Abbildung 8 A). Obwohl Immunoblot-Analysen von RpoTp-Präparationen darauf hindeuten, dass es sich bei vielen der zusätzlich auftretenden Proteine um Degradationsprodukte des rekombinanten Enzyms handelt (Daten nicht gezeigt), konnte ein Einfluss kontaminierender bakterieller Proteine auf die Transkription oder die transkriptionellen Eigenschaften der rekombinanten RpoTs nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden Präparationen der rekombinanten Enzyme RpoTm und RpoTmp chromatographisch aufgereinigt (Abbildung 27 A). Zunächst wurden beide Proteine wie zuvor beschrieben über Ni^{2+} -NTA-Agarose angereichert (Spuren „Ni“) und das erhaltene Eluat anschließend über Heparin-Sepharose weiter aufgereinigt (Spuren „Hep“; Kap. 2.2.5.1.3.1).

Nach diesen Reinigungsschritten konnte mittels einer sensitiven Silberfärbung in der RpoTmp-Präparation keine Verunreinigung durch bakterielle Proteine mehr nachgewiesen werden (Panel RpoTmp, Spur „Hep“). Die RpoTm-Präparation wies noch einige zusätzliche Proteine auf, bei denen es sich um durch die Heparinsäule angereicherte DNA-bindende Proteine oder RpoTm-Degradationsprodukte handeln könnte, so dass eine Gelfiltration angeschlossen wurde (Kap. 2.2.5.1.3.1). Die anschließende Silberfärbung zeigte keine weiteren Proteinverunreinigungen (Panel RpoTm, Spur „GF“).

Das transkriptionelle Verhalten der aufgereinigten RNA-Polymerasen wurde im *in vitro*-Assay untersucht (Abbildung 27 B). Die Erkennung des *Patp8-228/226* Promotors und die Transkriptionsinitiation durch RpoTm blieben über alle Schritte der Reinigung unverändert (Spuren „Ni“, „Hep“, „GF“). In ähnlicher Weise zeigte auch die hochreine RpoTmp-Präparation ein unverändertes Verhalten in der *in vitro*-Transkription und war wie zuvor nicht in der Lage angebotene Promotoren spezifisch zu transkribieren (Daten nicht gezeigt). Damit widerlegen die Experimente weitestgehend die Möglichkeit einer Partizipation bakterieller Proteine an der Transkription organellärer Promotoren durch die rekombinanten Enzyme und unterstützen die Annahme, dass es sich bei der Promotorerkennung um eine intrinsische Fähigkeit von RpoTm und RpoTp handelt. Im Gegenteil, es kann sogar davon ausgegangen werden, dass die *E. coli* Wirtsproteine, die unspezifisch an die Ni^{2+} -NTA-Agarose binden, keinen stimulierenden sondern einen eher negativen Effekt auf die Transkription durch RpoTm haben, da die Synthese spezifischer Transkripte durch eine hochreine RpoTm-

Präparation bei Zugabe einer Präparation von an Ni^{2+} -NTA-Agarose aufgereinigten Wirtsproteinen sogar vermindert wurde (Daten nicht gezeigt).

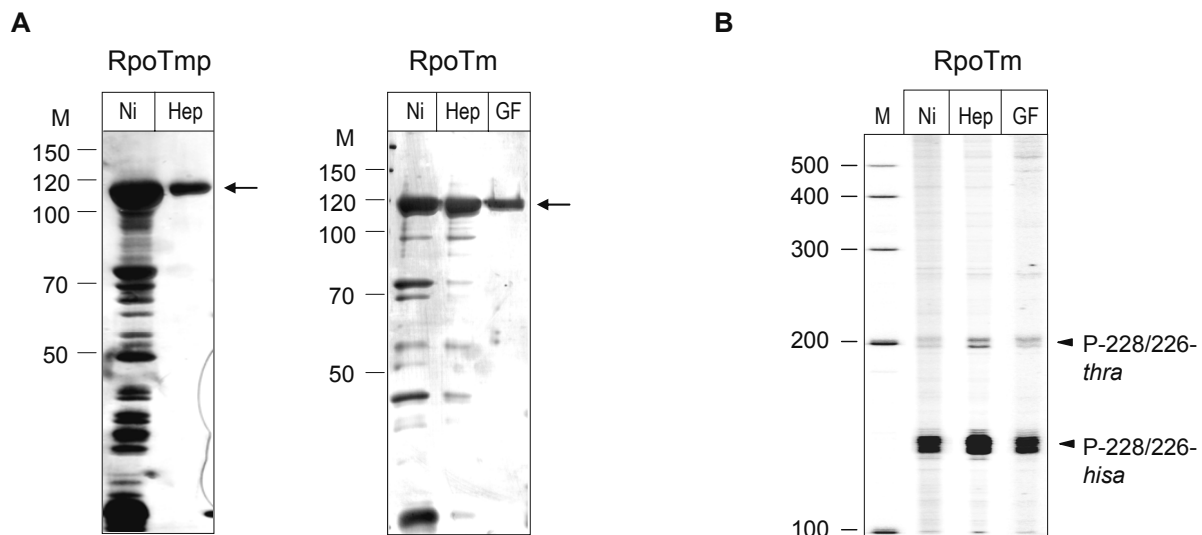


Abbildung 27: Unveränderte Promotorspezifität hochaufgereinigter rekombinanter Phagentyp-RNA-Polymerasen. (A) Silbergefärbte Polyacrylamidgele zur Illustration der einzelnen Aufreinigungsschritte der Präparation von RpoTmp (links) und RpoTm (rechts). Die Trx-His-tag-fusionierten Enzyme wurden in *E. coli* exprimiert und über Ni^{2+} -NTA Agarose gereinigt (Spuren Ni). Das Ni^{2+} -NTA Agarose-Eluat wurde anschließend über Heparin-Sepharose (Hep) und im Fall von RpoTm eine sich anschließende Gelfiltration (GF) weiter aufgereinigt (Kap. 2.2.5.1.3). Parallel wurde ein Molekulargewichtsmarker (M) aufgetragen; die Größen sind in kD angezeigt. Die rekombinanten Enzyme sind durch einen Pfeil markiert. (B) Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von RpoTm im *in vitro*-Transkriptionsassay nach jedem der unter (A) beschriebenen Aufreinigungsschritte. Als DNA-Matrize diente der zirkuläre, superhelikale Vektor pKL23-*Patp8*-B (vgl. Abbildung 17). Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt und wurden nach der Bestimmung der Transkript-5'-Enden (vgl. Abbildung 18) der Initiation an *Patp8*-228/226 gefolgt von einer Termination an *hisa* (Signal P-228/226-*hisa*) und *thra* (Signal P-228/226-*thra*) zugeordnet. Transkriptanalyse und Beschriftung wie beschrieben in Abbildung 9 A.

3.1.9 Untersuchung potentieller Transkriptionsfaktoren der Phagentyp-RNA-Polymerasen

Trotz der intrinsischen Fähigkeit von RpoTm und RpoTp diverse Promotoren *in vitro* zu transkribieren, lassen die Daten erwarten, dass *in vivo* Kofaktoren an der Transkription der organellären Gene beteiligt sind (vgl. Kap. 3.1.7). Mit Hilfe des definierten *in vitro*-Transkriptionssystems sollte daher der Einfluss einiger möglicher RpoT-Transkriptionsfaktoren auf die Promotorerkennung und synthetisierte Transkriptmenge untersucht werden.

Bereits zuvor konnten durch BLAST-Analysen drei mögliche Homologe der mtTFB-Faktoren aus Hefe und Mensch als Kandidaten für pflanzliche Kofaktoren der organellären Transkription in *Arabidopsis* identifiziert werden [Kühn, 2005, K. Liere, unveröffentlichte Daten]. Für diese drei RNA-Dimethyltransferase-ähnlichen Proteine, MetA (At5g66360), MetB (At2g47420) und MetC (At1g01860), konnte durch GFP-Importstudien eine mitochondriale (MetA), eine nukleäre bzw. cytoplasmatische (MetB) und eine plastidäre (MetC) Lokalisierung gezeigt werden [Kühn, 2005, B. Kuhla, unveröffentlichte Daten]. *In vitro*-Transkriptionsassays mit rekombinantem MetA-Protein lieferten jedoch im Gegensatz zu mtTFB keinen Hinweis auf eine Beteiligung des Enzyms an der mitochondrialen Genexpression [Kap. 3.1.7, Kühn, 2005].

Für das Protein MetC, das zuvor als plastidäre 18S rRNA-Dimethyltransferase Pfc1 identifiziert wurde [Tokuhisa et al., 1998], lagen bislang keine experimentellen Daten über einen möglichen Einfluss auf die Expression plastidärer Gene vor. Da sowohl die GFP-Importdaten (s. o.), die Daten von Tokuhisa (s. o.) als auch die *in silico* Analyse der Transitsequenz (Tabelle 12:) für ein plastidäres *targeting* sprechen, sollte der Einfluss von rekombinantem MetC auf die Transkriptionseffizienz von RpoTp und RpoTmp in *in vitro*-Experimenten überprüft werden (Abbildung 28). Hierzu wurde das Protein ohne das durch TargetP vorhergesagte

Tabelle 12: Vorhergesagte Eigenschaften für das Protein MetC (Pfc1; At1g01860)

Reifes Protein^a	
Länge	295 AS
Molekulargewicht	33,0 kD
pI	7,93
Subzelluläre Lokalisation	
TargetP 1.1 ^b	plastidär
PCLR 0.9 ^c	plastidär
Predotar 1.03 ^d	plastidär
ChloroP ^e	plastidär
iSort ^f	plastidär
N-terminales Transitpeptid	
TargetP 1.1 ^b	48 AS
ChloroP ^e	53 AS
PsortII ^f	45 AS

^a Physikochemische Parameter wurden mit Hilfe des Programms ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) abgeleitet.

^b <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP> (Nielsen et al. 1997; Emanuelsson et al. 2000)

^c <http://www.andrewschein.com/pclr/> (Schein et al. 2001)

^d <http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html> (Small et al. 2004)

^e <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

^f <http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/> (Bannai et al. 2002)

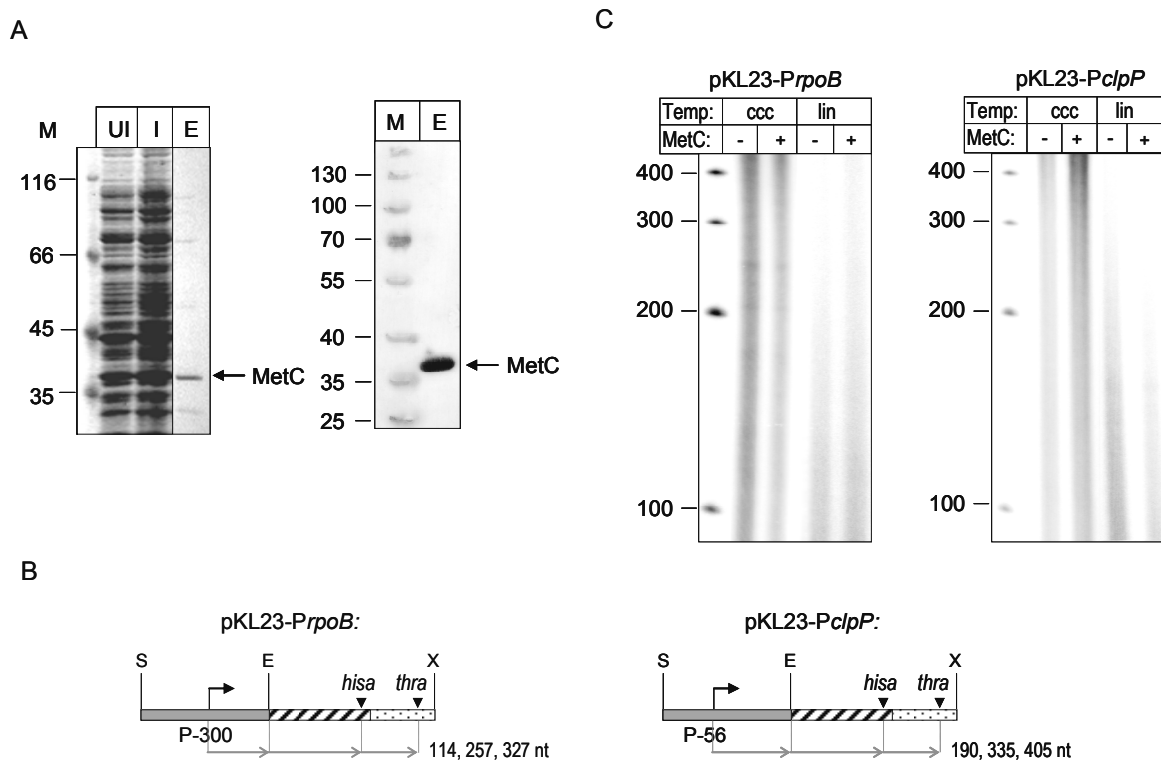


Abbildung 28: Untersuchung des Einflusses von MetC auf die Erkennung plastidärer Promotoren durch RpoTp. (A) Expression und Aufreinigung von rekombinantem MetC. Das N-terminal mit einem Hexahistidin-tag fusionierte Protein wurde in *E. coli* exprimiert (linkes Panel, Kap. 2.2.5.1.2.3), über Ni^{2+} -NTA Agarose gereinigt (Kap. 2.2.5.1.3.2) und durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Kap. 2.2.5.2.2). Parallel wurde ein Molekulargewichtsmarker (M) aufgetragen; die Größen sind in kD angezeigt. Das rekombinante Protein ist durch einen Pfeil markiert und korrespondiert in der Größe mit dem durch ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) vorhergesagten Molekulargewicht von 35,3 kD. UI: *E. coli* Gesamtprotein, uninduziert; I: *E. coli* Gesamtprotein, induziert; E: Ni^{2+} -NTA Agarose-Eluat. Die Identität des exprimierten Proteins wurde durch Immunodetektion des Hexahistidin-tags bestätigt (rechtes Panel, Kap. 2.2.5.2.3). (B) Schematische Darstellung der in die *in vitro*-Transkription eingesetzten Vektoren. Zur Konstruktion von pKL23-PrpoB und pKL23-PclpP wurden ~ 300 bp-cpDNA-Fragmente, die den Promotor PrpoB-300 bzw. PclpP-58 enthalten, über *SacI*/*EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Die erwarteten Transkripte bei Initiation an den inserierten Promotoren gefolgt von einer Termination an *hisa* und/oder *thra* oder an der für die Linearisierung verwendeten Restriktionsschnittstelle *EcoRI* (E) und entsprechende Transkriptlängen sind gekennzeichnet. Symbole wie in Abbildung 8 B. (C) RpoTp wurde auf promotor-spezifische Transkription von den superhelikalen (ccc) und linearen (lin) Vektoren pKL23-PrpoB und pKL23-PclpP in An- und Abwesenheit von rekombinantem MetC getestet. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A.

Transitpeptid im pPROTet-System mit einem N-terminalen Hexahistidin-tag in *E. coli* exprimiert (Abbildung 28 A) und das lösliche Protein über Ni^{2+} -NTA-Agarose aufgereinigt (A, linkes Panel, Spur E). Die Identität des rekombinanten Proteins wurde durch Immunodetektion des Histidin-tags bestätigt (A, rechtes Panel, Spur E). Das gereinigte rekombinante Protein wurde in äquimolaren Mengen bezogen auf die RpoTs in Transkriptionsreaktionen mit den

plastidären Promotoren *PrpoB*-300 und *PclpP*-58 auf linearen oder zirkulären Matrizen eingesetzt (Abbildung 28 B, C). In keiner der Reaktionen konnte eine Stimulation der Transkription oder eine Erkennung bislang nicht transkribierter Promotoren beobachtet werden (C, Spuren „+“). Auch RpoTmp zeigte in Reaktionen mit MetC ein unverändertes Transkriptionsverhalten (Daten nicht gezeigt).

Der mitochondriale HMG-Box-Faktor mtTFA erwies sich als essentiell für die Transkription in Humanmitochondrien und ist als *trans*-wirkender Faktor in Hefemitochondrien zwar nicht essentiell, vermutlich jedoch an der Ausbildung des Promotorkomplexes beteiligt (vgl. Kap. 1.2.4.2). Obwohl in Arabidopsis bislang keine HMG-Box-Proteine mit einer organellären Lokalisierung identifiziert werden konnten, wurde der Einfluss eines HMG-Proteins auf die Konformation der DNA-Matrize und damit auf die Transkriptionsinitiation durch die RpoT-Polymerasen im *in vitro* Assay untersucht. Die Zugabe des rekombinanten, *in vivo* Chromatin-assoziierten HMG2a aus Mais (zur Verfügung gestellt von K. D. Grasser, Aalborg), zeigte jedoch keinerlei stimulierenden Einfluss auf die *in vitro*-Transkription der plastidären Promotoren *PclpP*-58 und *PrpoB*-300 durch RpoTp (Daten nicht gezeigt).

In Arabidopsis konnte für einen Spezifitätsfaktor der PEP, AthSig1 (At1g64860), experimentell durch GFP-Importstudien in Tabak-Protoplasten eine Kolo-kalisierung in beiden Organellen gezeigt werden (H. Tandara und K. Liere, unveröffentlichte Daten), was eine potentielle Interaktion mit den mitochondrialen, aber auch mit den plastidären Phagentyp-RNA-Polymerasen impliziert (vgl. Kap. 1.2.4). Um eine mögliche Rolle von AthSig1 als Kofaktor der Phagentyp-RNA-Polymerasen zu überprüfen, wurde der mit einem N-terminalen Hexahistidin-tag fusionierte AthSig1 unter Verwendung des pTrc-His-Systems in *E. coli* exprimiert, durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt und durch Immunodetektion des Histidin-tags bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die anschließenden *in vitro*-Transkriptionsanalysen mit RpoTmp und RpoTp zusammen mit äquimolaren Mengen des Faktors AthSig1, zeigten allerdings keine veränderte Erkennung und Transkription der plastidären Promotoren *PrpoB*-300, *Prps4*-151, *PatpB*-318, *PaccD*-252, *Pycf1*-39, *Pycf1*-104, *PaccD*-172, *Prps15*-139, *Prrn16*-139 oder *PclpP*-58 (Daten nicht gezeigt).

3.1.10 Untersuchung der Terminatorfunktion des 3'-UTRs des mitochondrialen *atp9*-Gens

In den Organellen sind bislang keine dezidierten Terminatoren der Transkription durch Phagentyp-Polymerasen beschrieben worden. Von mitochondrialen Transkripten in Pflanzen wird

angenommen, dass die Termination durch Nukleasen erfolgt, die das RNA-3'-Ende definieren [Dombrowski et al., 1997; Forner et al., 2007; Perrin et al., 2004]. Ausgehend von den Klasse I-Terminationssignalen der nahe verwandten T7-RNAP ist ebenfalls eine Termination durch eine sich ausbildende Sekundärstruktur in der naszierenden RNA denkbar (vgl. Kap. 1.2.5).

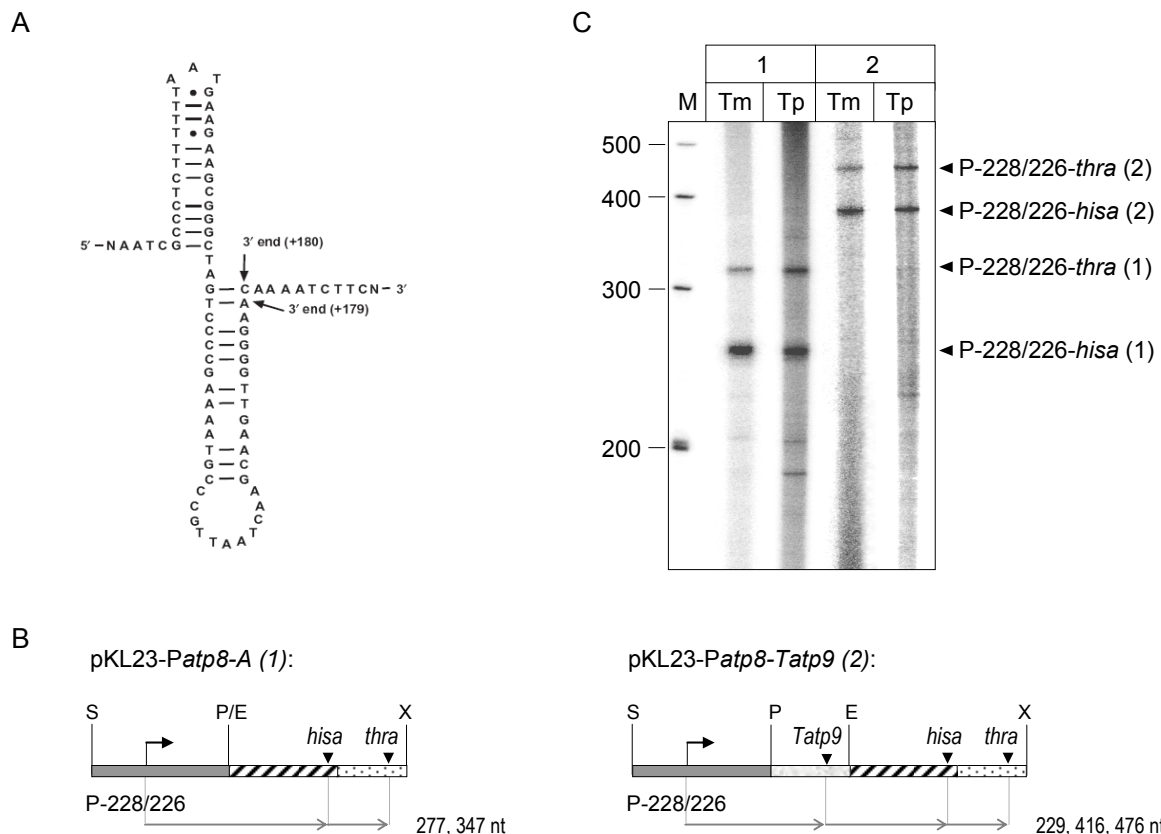


Abbildung 29: Untersuchung des Terminationspotentials des 3'-UTRs des mitochondrialen *atp9*-Gens aus Arabidopsis. (A) Stromaufwärts vom 3'-Ende des *atp9*-Transkriptes liegende Doppel-Haarnadelstruktur. Terminierende Nukleotide sind durch Pfeile und ihre Position in Bezug zum Stopkodon gekennzeichnet (1. Nukleotid stromabwärts vom Stopkodon entspricht der Position +1). Abbildung aus Forner et al. [2007]. (B) Schematische Darstellung der Vektoren pKL23-Patp8-A und pKL23-Patp8-Tatp9. Zur Konstruktion von pKL23-Patp8-Tatp9 (rechts) wurde ein 139 bp mtDNA-Fragment, das die unter (A) gezeigte 3'-UTR-Region des *atp9*-Gens enthält, über *PstI/EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pKL23-Patp8-A (links) inseriert. Die 3'-terminalen Nukleotide (*Tatp9*) an den Positionen +179/180 (s. A) sind durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die erwarteten Transkripte bei Initiation am *Patp8*-228/226-Promotor gefolgt von einer Termination an *Tatp9* bzw. *hisa* und/oder *thra* und entsprechende Transkriptlängen sind angezeigt. Zur Vereinfachung wurde der *in vitro* lediglich durch 5'-RACE detektierbare Promotor *Patp8*-157 nicht dargestellt (vgl. Abbildung 9 B). Symbole wie in Abbildung 9 B. (C) *In vitro*-Transkriptionsassay zur Untersuchung des Terminationspotentials von *Tatp9* nach promotorspezifischer Initiation an *Patp8*-228/226 durch RpoTm (Tm) und RpoTp (Tp). Die Vektoren pKL23-Patp8-A (1) und pKL23-Patp8-Tatp9 (2) wurden in superhelikaler Form angeboten. Spezifische RNA-Produkte, die aufgrund der Länge einer Initiation an *Patp8*-228/226 und Termination an *hisa* (Signal P-*hisa*) bzw. *thra* (Signal P-*thra*) zugeordnet wurden, sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Transkriptanalyse wie beschrieben in Abbildung 9 A.

Diese Überlegung wird dadurch gestützt, dass sowohl für die T7-RNAP als auch für RpoTm und RpoTp eine effiziente Termination an *E. coli* Attenuatoren (*hisa/thra*) demonstriert wurde (vgl. vorherige Kapitel). Kürzlich konnten Forner et al. [2007] zahlreiche 3'-terminale Regionen mitochondrialer Transkripte aus Arabidopsis detektieren. Die nahezu identischen 3'-UTRs des *atp9*- und *nad1*-Gens zeichnen sich durch eine Doppel-Haarnadelstruktur exakt stromaufwärts des Transkriptendes aus (Abbildung 29 A), die keiner bekannten Nuklease-Prozessierungssequenz entspricht. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Haarnadelstruktur um ein mitochondriales Terminationssignal für die Phagentyp-RNA-Polymerasen handelt, wurde die entsprechende 3'-Region des *atp9*-Gens (*Tatp9*) stromaufwärts der bakteriellen Attenuatoren *hisa/thra* in den Vektor pKL23-*Patp8*-A inseriert (Abbildung 29 B). Bei *in vitro*-Transkription des Vektors pKL23-*Patp8*-*Tatp9* sollten im Falle einer Termination der RNA-Polymerasen am inserierten 3'-UTR Transkripte definierter Länge entstehen. Sowohl die mitochondrialen Enzyme RpoTm und RpoTnp als auch die plastidäre RNAP RpoTp wurden im *in vitro*-Assay auf eine mögliche Termination an *Tatp9* untersucht. RpoTm und RpoTp lieferten hierbei Transkripte der erwarteten Länge bei einer Termination an *hisa* und *thra*, aber nicht für eine Termination an *Tatp9* (Abbildung 29 C). RpoTnp synthetisierte auch hier keine spezifischen RNAs (Daten nicht gezeigt). Demnach fungierte die Haarnadelstruktur des 3'-UTR des untersuchten *atp9*-Gens zumindest *in vitro* für keines der rekombinanten Enzyme als Terminationssignal und könnte *in vivo* eher als Prozessierungssignal dienen.

3.1.11 RpoT-Inhibitorstudien

Im Gegensatz zu der plastidenkodierten, Bakterientyp-RNA-Polymerase sind bislang keine spezifischen Hemmstoffe der Phagentyp-RNA-Polymerasen bekannt. Das Vorliegen eines tatsächlich spezifischen Inhibitors der RpoTs könnte weitreichende Möglichkeiten bei der Analyse der organellären Gentranskription und der Aufklärung der molekularen Basis der DNA-abhängigen RNA-Synthese eröffnen.

3.1.11.1 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung des T7/SP6-RNA-Polymerase-Inhibitors Cyclothiazomycin B1

Kürzlich ist es Hashimoto et al. [2006] gelungen ein Thiopeptid-Antibiotikum aus Streptomyces, Cyclothiazomycin B1, zu isolieren und charakterisieren. Es zeigte sich, dass diese Substanz einen inhibitorischen Effekt auf die DNA-abhängige RNA-Synthese durch die RNAPs der Bakteriophagen T7 und SP6 hat, wogegen das als Kontrolle mitgeführte Thiopeptid-

Antibiotikum Thiostrepton keinen hemmenden Einfluss ausübte. Da die von den T7/SP6-RNA-Polymerasen erkannten Promotorsequenzen deutlich unterschiedlich sind, gehen die Autoren von einer Hemmung der Transkription aus.

Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft der Phagentyp-RNA-Polymerasen zu der des T7-Phagen sollte die mögliche inhibitorische Wirkung von Cyclothiazomycin B1 auf die rekombinanten RpoTs untersucht werden. Transkriptionsassays mit den Enzymen RpoTm und RpoTp in Anwesenheit verschiedener RNAP-Inhibitoren zeigten, dass beide Enzyme durch Cyclothiazomycin B1 inhibiert wurden (Abbildung 30 A, Panele RpoTm und RpoTp, Spuren „B1“), wogegen sie nur eine geringe Hemmung durch Rifampicin, einem Inhibitor bakterieller

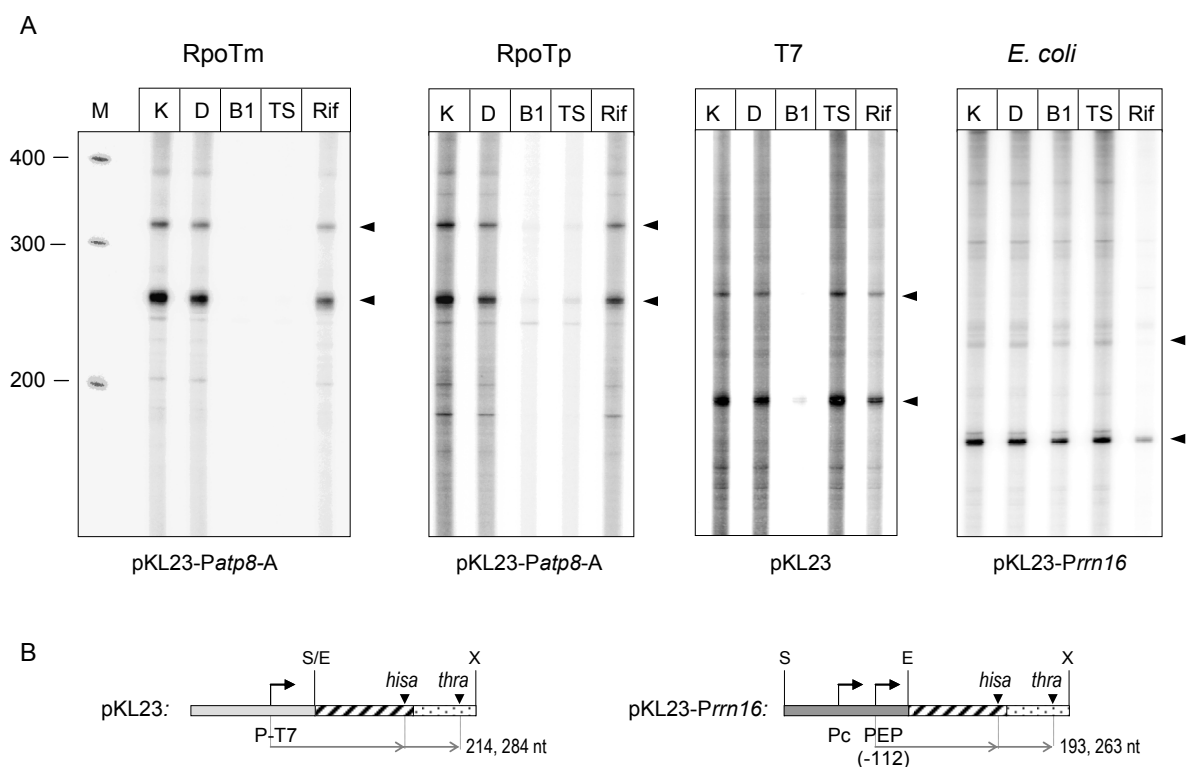


Abbildung 30: Inhibitorstudien zur Untersuchung des Einflusses von Cyclothiazomycin B1 auf die rekombinanten RNA-Polymerasen RpoTm und RpoTp. (A) RpoTm und RpoTp (je 900 fmol) wurden auf promotor-spezifische Transkription vom superhelikalen Vektor pKL23-Patp8-A (vgl. Abbildung 17 A) in Anwesenheit von 200 μ M Cyclothiazomycin B1 (B1), 200 μ M Thiostrepton (TS) oder 0,6 μ M (0,5 μ g/ml) Rifampicin (Rif) getestet. Entsprechend wurden 0,1 U T7-RNA-Polymerase (T7) und 0,05 U *E. coli* RNA-Polymerase σ^{70} -Holoenzym auf promotor-spezifische Transkription von den Vektoren pKL23 bzw. pKL23-Prrn16 in Anwesenheit von 400 μ M Cyclothiazomycin B1, 400 μ M Thiostrepton oder 0,6 μ M Rifampicin untersucht. Als Kontrollen fungierten Ansätze ohne Zugabe von Inhibitoren (K) bzw. Ansätze mit DMSO (D). Spezifische RNA-Produkte, die einer Initiation an den inserierten Promotoren und Termination an *hisa* bzw. *thra* entsprechen, sind durch Pfeilspitzen angezeigt. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. (B) Schematische Darstellung der Vektoren pKL23 und pKL23-Prrn16. Der von der T7-RNA-Polymerase erkannte T7-Promotor (P-T7) auf dem Vektor pKL23 bzw. der von der *E. coli*-RNA-Polymerase erkannte Bakterientyp-PEP-Promotor (PEP-112) und entsprechende Transkriptlängen sind gekennzeichnet. Symbole wie in Abbildung 8 B.

ler RNA-Polymerasen aufwiesen (Spuren „Rif“). Allerdings wurden beide RpoTs auch durch vergleichbare molare Mengen der Kontrollsubstanz Thiostrepton inhibiert (Spuren „TS“). Zur vergleichenden Analyse wurden zudem die T7- und die *E. coli*-RNAP in die Studien miteinbezogen. Hierbei erfolgte die Transkription durch die T7-RNAP vom Vektor pKL23, der stromaufwärts der Terminatoren *hisa/thra* einen T7-Promotor enthält, die durch das *E. coli*-Enzym vom Vektor pKL23-*Prrn16*, der den PEP-Promotor *Prrn16*-112 aufweist und von dem bakteriellen Protein erkannt wird (Abbildung 30 B). Für die T7-RNAP konnte die von Hashimoto et al. [2006] detektierte Inhibition durch Cyclothiazomycin B1 im *in vitro* Assay eindeutig bestätigt werden (Abbildung 30 A, Panel T7, Spur „B1“). Die Zugabe des Antibiotikums Thiostrepton zeigte, wie beschrieben, keinen hemmenden Effekt auf das Bakteriophagen-Enzym (Panel T7, Spur „TS“). Die *E. coli* RNAP ließ sich lediglich durch den bakteriellen RNA-Polymerase-Inhibitor Rifampicin hemmen und zeigte eine unveränderte transkriptionelle Aktivität in Anwesenheit der Thiopeptid-Antibiotika (Panel *E. coli*). Da im Gegensatz zur T7-RNA-Polymerase auch das Kontrollsubstrat Thiostrepton zu einer Inhibition der rekombinanten RNA-Polymerasen RpoTm, RpoTp und RpoTmp (Daten für Tmp nicht gezeigt) im *in vitro*-Transkriptionsassay führte, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die gesehene Inhibition lediglich auf einer Störung des empfindlichen *in vitro*-Systems durch die zugegeben Substanzen und nicht auf einer spezifischen Inhibition der RpoTs beruht. Es wurden daher zusätzliche Analysen mit Cyclothiazomycin B1 durchgeführt, die zugleich die biologische Anwendbarkeit dieser Substanz belegen sollten. Es wurde zunächst die Keimung von Arabidopsis WT-Samen auf Cyclothiazomycin B1-haltigen (500 µM) SEA-Platten untersucht. Es zeigte sich hierbei jedoch kein Unterschied in der Keimungsrate oder im Phänotyp verglichen mit Keimlingen, die ohne das Antibiotikum angezogen wurden (Daten nicht gezeigt). Auch *Run On*-Experimente (Kap. 2.2.4) mit isolierten Arabidopsis Chloroplasten in An- und Abwesenheit des potentiellen Inhibitors Cyclothiazomycin B1 zeigten keine signifikant veränderte Transkription der untersuchten plastidären Gene (Daten nicht gezeigt). Die durchgeführten Untersuchungen deuten somit nicht auf eine spezifische Hemmung der RpoTs durch den T7-RNAP-Inhibitor Cyclothiazomycin B1 hin.

3.1.11.2 Untersuchungen zur Regulation der Phagentyp-RNA-Polymerase-Aktivität durch tRNA^{Glu}

Kürzlich wurde von Hanaoka et al. [2005] berichtet, dass die vom plastidären *trnE*-Gen kodierte, PEP-transkribierte tRNA^{Glu} direkt und spezifisch an rekombinantes RpoTp-Protein aus

Arabidopsis bindet und die RNA-Polymeraseaktivität durch Verhinderung der Bindung an die DNA hemmt (vgl. Kap. 1.2.5).

Um diese postulierte Regulation von RpoTp durch $tRNA^{Glu}$ auf der Ebene der Transkription näher zu beleuchten, wurde zunächst das rekombinante Enzym RpoTp zusammen mit der *in vitro* transkribierten plastidären $tRNA^{Glu}$ aus Arabidopsis und alternativ anderen plastidären tRNAs ($tRNA^{Gly}$, $tRNA^{Val}$) zur Kontrolle auf eine spezifische Hemmung der Transkription des plastidären *Pycf1*-NEP-Promotors und des mitochondrialen *Patp8*-226/228-Promotors hin untersucht (Abbildung 31). Die in Anwesenheit variabler tRNAs durchgeführten Experimente

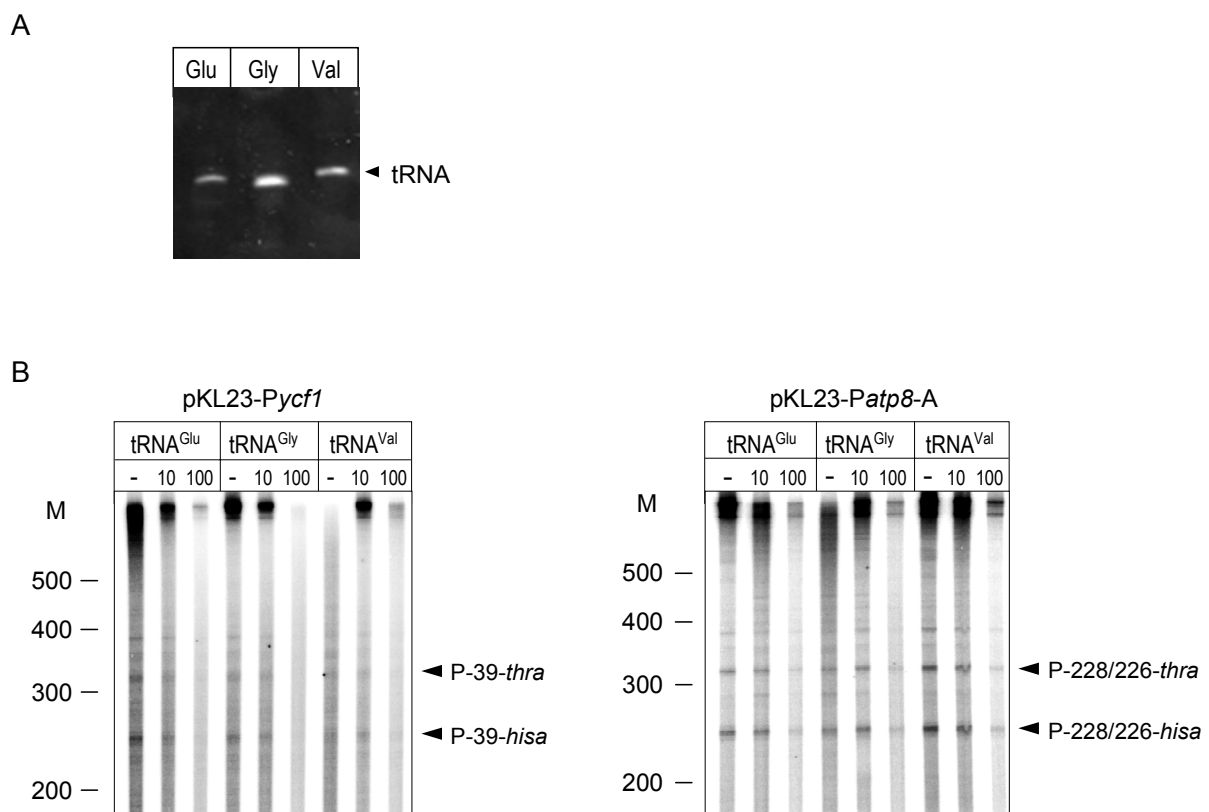


Abbildung 31: Hemmung rekombinanter RpoTp durch variable tRNAs im *in vitro*-Transkriptionsassay. (A) Illustration *in vitro* synthetisierter tRNAs (Kap. 2.2.7.2). Jeweils 1 μ g $tRNA^{Glu}$ (Glu), $tRNA^{Gly}$ (Gly), $tRNA^{Val}$ (Val) wurden auf einem 10%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung und UV-Transillumination visualisiert (Kap. 2.2.3.2.3). Die synthetisierten tRNAs sind durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. (B) Die Promotor-spezifische Transkription wurde von den superhelikalen Plasmiden pKL23-Pycf1 (links) und pKL23-Patp8-A (rechts) in Gegenwart von ansteigenden Mengen $tRNA^{Glu}$, $tRNA^{Gly}$ und $tRNA^{Val}$ getestet (tRNA/Protein, Molare Ratios: 10, 100). Distinkte RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet und korrespondieren mit einer Transkriptionsinitiation an den Promotoren *Pycf1*-39 bzw. *Patp8*-228/226 gefolgt von einer Termination an *hisa* und *thra*. Erwartete Transkriptgrößen wie gezeigt in Abbildung 13 B und Abbildung 17 A. Transkriptanalyse wie beschrieben in Abbildung 9 A.

zeigten, dass die Zugabe von tRNA^{Glu} in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge zu einer deutlichen Inhibition der spezifischen sowie unspezifischen (obere Banden und „Schmier“) Transkription durch RpoTp führte (Spuren 1-3). Allerdings konnte dieser Effekt auch bei Einsatz der von Hanaoka et al. [2005] als nicht-hemmend beschriebenen tRNAs für Val und Gly beobachtet werden (Spuren 4-9).

Da die gezeigten Ergebnisse die von Hanaoka et al. [2005] durchgeführten Experimente nur bedingt bestätigten, sollte durch elektrophoretische Mobilitätsassays und Konkurrenzexperimente die spezifische Bindung von tRNA^{Glu} an RpoTp überprüft werden. Bindungsstudien mit dem aufgereinigten rekombinanten RpoTp-Protein und tRNA^{Glu} zeigten ein deutlich verändertes Migrationsverhalten des RpoTp-tRNA^{Glu}-Komplexes im Polyacrylamidgel (Abbildung 32 A). Die Bindung der tRNA^{Glu} an RpoTp ließ sich allerdings sowohl durch die Zugabe nicht-radioaktivmarkierter tRNA^{Glu}, als auch durch tRNA^{Val} und tRNA^{Gly} kompetitieren und erwies sich demnach als für tRNA^{Glu} unspezifisch. Weitere Studien konnten die Spezifität der Bindung von tRNA^{Glu} an RpoTp ebenfalls nicht bestätigen, da auch für die rekombinanten Enzyme RpoTm und RpoTmp eine Bindung dieser tRNA gezeigt werden konnte (Abbildung 32 B). Auch diese Bindungen ließen sich durch Zugabe nicht-radioaktivmarkierter

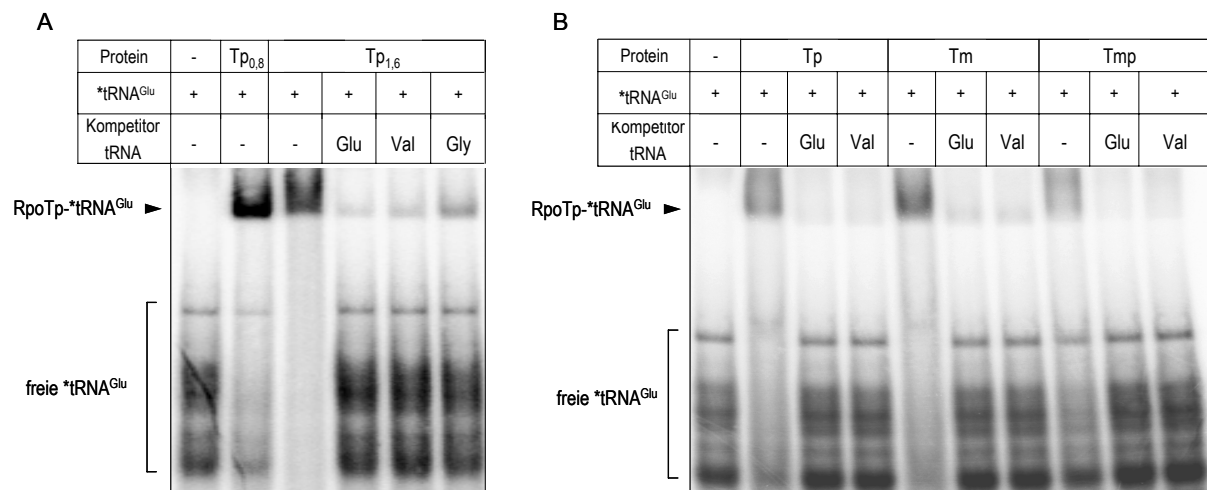


Abbildung 32: Elektrophoretischer Mobilitätsassay (Kap. 2.2.6) (A) nach Inkubation von 0,4 pmol ³²P-markierter tRNA^{Glu} mit 0,8 pmol (TP_{0,8}) und 1,6 pmol (TP_{1,6}) rekombinanter RpoTp in Ab- oder Anwesenheit nicht-markierter tRNA^{Glu} (Glu), tRNA^{Val} (Val) oder tRNA^{Gly} (Gly). (B) nach Inkubation von 0,4 pmol ³²P-markierter tRNA^{Glu} mit 1,6 pmol rekombinanter RpoTp (Tp), RpoTm (Tm) oder RpoTmp (Tmp) in Ab- oder Anwesenheit von 40 pmol nicht-markierter tRNA^{Glu} (Glu) oder tRNA^{Val} (Val). Die RNA/Proteinkomplexe wurden auf nativen 5%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert (Kap. 2.2.3.2.4).

tRNA^{Glu} und tRNA^{Val} kompetitieren. Es scheint sich hier eher um eine unspezifische RNA-Polymerase-tRNA-Bindung als um eine spezifische Interaktion der RpoTs mit tRNA^{Glu} zu handeln.

3.1.12 RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität der RpoT-Polymerasen

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTm, RpoTmp und RpoTp um DNA-abhängige RNA-Polymerasen handelt. Von der T7-RNAP ist bekannt, dass dieses Enzym zudem eine RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität besitzt [Arnaud-Barbe et al., 1998; Biebricher und Luce, 1996; Konarska und Sharp, 1989; Konarska und Sharp, 1990]. Es sollte daher untersucht werden, ob die rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTm, RpoTmp und RpoTp ebenfalls in der Lage sind, RNA-Matrizen zu transkribieren.

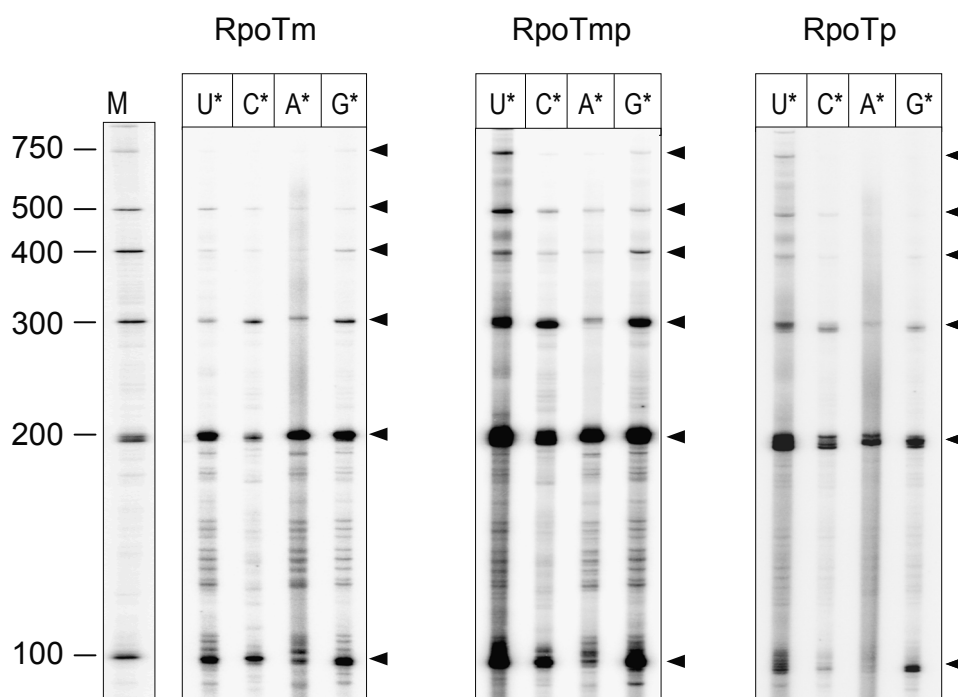


Abbildung 33: Endmarkierung einer unspezifischen RNA-Matrize durch RpoTm, RpoTmp und RpoTp (Kap. 2.2.7.3). Als RNA-Matrize diente der in Abwesenheit von radioaktiv-markiertem UTP durch T7-RNA-Polymerase synthetisierte, DNaseI verdaute RNA-Längenstandard (*RNA Century Marker Template Set*, Ambion; Kap. 2.2.7.1.4). Je 900 fmol RNA-Polymerase wurden auf die Fähigkeit zum Anhängen radioaktiv-markierter Nukleotide (je 10 μ Ci [α -³²P]-UTP (U*), [α -³²P]-CTP (C*), [α -³²P]-ATP (A*) oder [α -³²P]-GTP (G*)) an den RNA-Längenstandard (55 ng) untersucht. Spezifische RNA-Transkripte sind durch Pfeilspitzen markiert. Als Referenz diente der in Gegenwart von [α -³²P]-UTP durch T7-RNA-Polymerase synthetisierte RNA-Längenstandard (M; Kap. 2.2.3.2.3).

Zunächst wurde die Fähigkeit der RpoTs überprüft einzelne definierte Nukleotide an eine RNA-Matrize anzuhängen. Als unspezifische RNA-Matrize für die *in vitro*-Transkription diente ein nicht-radioaktivmarkierter RNA-Längenstandard (Kap. 2.2.7.1.4). Die Transkriptionsreaktion durch die RpoTs wurde in Gegenwart der radioaktiv-markierten Nukleotide UTP, CTP, ATP oder GTP durchgeführt. Wie in Abbildung 33 dargestellt, konnte das für den RNA-Marker typische Bandenmuster (vgl. Spur „M“, links) durch Anhängen eines oder weniger radioaktiver Nukleotide an die RNA-Matrize durch alle drei RNA-Polymerasen erzeugt werden. Es schien dabei keine besondere Präferenz für eines der vier angebotenen Nukleotide vorzuliegen. Der z. T. beobachtete „Schmier“ und zusätzlich auftretende Produkte könnten das Anhängen mehrerer Nukleotide oder die Markierung gering abundanter RNA-Matrizen, die bei der Synthese des RNA-templates durch vorzeitige Termination entstehen, andeuten. Weitere *in vitro*-Transkriptionsversuche sollten Hinweise darauf liefern, ob die RpoTs über das Anhängen einzelner Nukleotide hinaus in der Lage sind, die angebotene RNA-Matrize

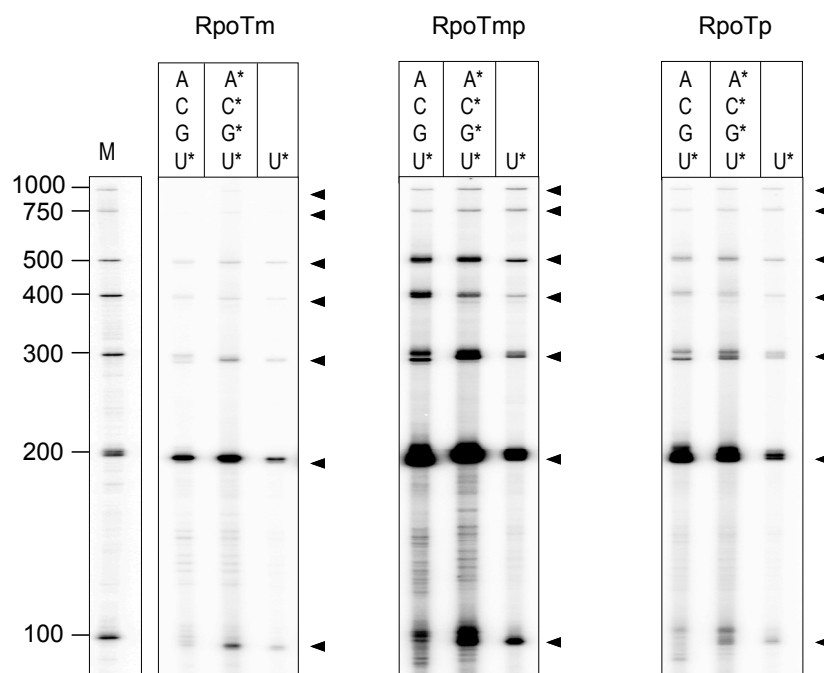


Abbildung 34: *In vitro*-Transkription einer unspezifischen RNA-Matrize durch RpoTm, RpoTmp und RpoTp (Kap. 2.2.7.3). Als RNA-*template* diente der in Abwesenheit von radioaktiv-markierten UTP durch T7-RNA-Polymerase synthetisierte, DNaseI verdaute RNA-Längenstandard (*RNA Century Marker Template Set*, Ambion; Kap. 2.2.7.1.4). Je 900 fmol RNA-Polymerase wurden auf die Fähigkeit zur Transkription der RNA-Matrize (55 ng) in Gegenwart von 5 μCi [α - ^{32}P]-UTP (U*) und 133 μM nicht-markierter Nukleotide (ATP (A), CTP (C), GTP (G)) bzw. 5 μCi radioaktiv-markierter Nukleotide ([α - ^{32}P]-CTP (C*), [α - ^{32}P]-ATP (A*), [α - ^{32}P]-GTP (G*)) untersucht wie angezeigt. Spezifische RNA-Transkripte sind durch Pfeilspitzen markiert. Als Referenz diente der in Gegenwart von [α - ^{32}P]-UTP durch T7-RNA-Polymerase synthetisierte RNA-Längenstandard (M; Kap. 2.2.3.2.3).

vollständig zu transkribieren. In den vergleichenden Reaktionen wurden zusätzlich zu dem radioaktiven UTP die markierten oder nicht-markierten Nukleotide ATP, GTP und CTP angeboten (Abbildung 34). Es zeigte sich, dass bei Angebot aller Nukleotide (Spuren 1 und 2) der radioaktive Einbau höher war als bei Zugabe von lediglich markiertem UTP (Spur 3). Besonders deutlich wird dies beim Vergleich der Spuren 1 und 3, da hier die Zunahme der Signalintensität lediglich auf vermehrtem UTP-Einbau beruhen kann. Da sich jedoch die Länge der detektierten Produkte nicht änderte, ist eine Transkription der RNA-Matrize wahrscheinlicher als das einfache Anhängen mehrerer Nukleotide. Die durchgeführten Versuche belegen deutlich eine wahrscheinlich unspezifische RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität der rekombinanten RpoTs, wobei auch hier das Enzym RpoTmp im Vergleich zu RpoTp und RpoTm wie bei der Transkription von DNA-Matrizen (vgl. Kap. 3.1) eine höhere Prozessivität aufwies. Eine vom T7-Promotor ausgehende Transkription der RNA-Matrize durch die rekombinanten RpoTs ist unwahrscheinlich, da dieser Promotor in vorherigen *in vitro*-Studien (vgl. Kap. 3.1.1) nicht transkribiert wurde.

3.2 Transkription eines mitochondrialen Promotors in transgenen Plastiden

Die Transkriptionssysteme der Mitochondrien und Plastiden weisen auffällige Gemeinsamkeiten auf. Alle mitochondrialen Gene und ein Teil der plastidären Gene werden durch miteinander verwandte Phagentyp-RNA-Polymerasen transkribiert (vgl. Kap. 1.2.2). Hinzu kommt, dass viele der organellären Promotoren eine ähnliche strukturelle Organisation zeigen (vgl. Kap. 1.2.3, Tabelle 13). In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Enzyme RpoTm und RpoTp trotz verschiedener *in vivo* Lokalisierungen *in vitro* eine überlappende Gruppe mitochondrialer und plastidärer Promotoren erkennen. Die Tatsache, dass RpoTp viele der mitochondrialen Promotoren ähnlich effizient erkannte wie das Enzym RpoTm, führte zu der Überlegung, inwieweit das plastidäre Transkriptionssystem *in planta* in der Lage ist, an mitochondrialen Promotoren korrekt zu initiieren. Um die Aktivität eines mitochondrialen Promotors in Plastiden zu untersuchen, wurde einer der am umfangreichsten charakterisierten mitochondrialen Promotoren, der *atpA*-Promotor aus *Oenothera berteriana* ausgewählt [Binder und Brennicke, 1993]. Dieser Promotor weist ein in die Konsensussequenz eingebettetes YRTA-Motiv auf und wird im Folgenden entsprechend des 209 nt stromaufwärts des Translationsstarts liegenden Transkriptionsinitiationsortes als *PatpA-209* bezeichnet.

3.2.1 Erkennung des mitochondrialen *PatpA* Promotors durch eine plastidäre und eine mitochondriale Phagentyp-RNA-Polymerase *in vitro*

Um zu untersuchen, ob die Arabidopsis RNA-Polymerasen RpoTm, RpoTtp und RpoTp die intrinsische Fähigkeit zur Erkennung und Transkription des mitochondrialen *PatpA*-Promotors aus *Oenothera* besitzen, wurden zunächst *in vitro*-Transkriptionsstudien durchgeführt (Abbildung 35). Hierzu wurde die *PatpA*-Promotorregion stromaufwärts der Terminations-signale *hisa/thra* in den Vektor pKL23 inseriert (Abbildung 35 B). Der resultierende Vektor pKL23-*PatpA* wurde in superhelikaler Form in *in vitro*-Transkriptionsassays mit den rekombinanten Enzymen RpoTm, RpoTtp und RpoTp aus Arabidopsis (vgl. Kap. 3.1) eingesetzt (Abbildung 35 A). Die Transkription durch RpoTm und RpoTp lieferte, wie für eine Initiation

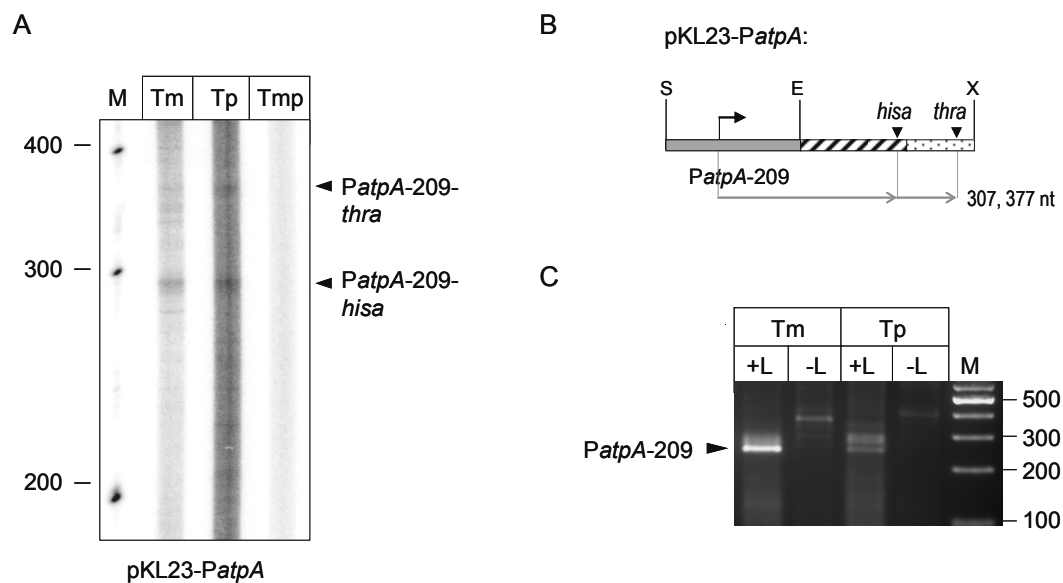


Abbildung 35: *In vitro*-Transkription des mitochondrialen Promotors *PatpA*-209. (A) RpoTm (Tm), RpoTp (Tp) und RpoTtp (Ttp) wurden auf promotor-spezifische Transkription vom superhelikalen Vektor pKL23-*PatpA* getestet. Spezifische RNA-Produkte sind durch Pfeilspitzen angezeigt und wurden nach der Bestimmung der Transkript-5'-Enden (s. (C)) der Initiation an *PatpA*-209 gefolgt von einer Termination an *hisa* und *thra* zugeordnet. Transkriptanalyse und Beschriftung wie in Abbildung 9 A. (B) Zur Konstruktion des Vektors pKL23-*PatpA* wurde ein 240 bp-mtDNA-Fragment aus *Oenothera berteriana*, das den Promotor *PatpA*-209 enthält, über *SacI*/*EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in pKL23 inseriert. Die erwarteten Transkripte bei Initiation an *PatpA*-209 gefolgt von einer Termination an *hisa* und *thra* und entsprechende Transkriptlängen sind gekennzeichnet. Symbole wie in Abbildung 8 B. (C) 5'-RACE der *in vitro* von RpoTm und RpoTp synthetisierten RNA (Kap. 2.2.3.8). Transkripte mit einem ligierten 5'-RNA-Linker (+L) und als Kontrolle nicht-ligierte Transkripte (-L) wurden einer RT-PCR unterzogen. Die PCR-Produkte wurden parallel zu einem DNA-Längenstandard (M; Angaben in bp) in Agarosegelen aufgetrennt, kloniert und sequenziert. Das dem 5'-Ende entsprechende Signal ist durch den dazugehörigen Promotornamen und Initiationsort gekennzeichnet.

an *PatpA* und anschließender Termination an *hisa/thra* erwartet, jeweils zwei deutliche RNA-Produkte mit einer Größe von etwa 310 und 380 nt (Spuren Tm, Tp). Dagegen konnten für RpoTm keine spezifischen Transkripte detektiert werden (Spur Tmp).

Um den genauen Startpunkt der *in vitro* durch RpoTm und RpoTp synthetisierten Transkripte zu bestimmen, wurde eine 5'-RACE-Analyse vorgenommen (Abbildung 35 C, Kap.2.2.3.8). Die Sequenzierung der korrespondierenden PCR-Produkte ließ erkennen, dass RpoTm den Promotor *PatpA* exakt transkribierte. Alle detektierten *in vitro*-Startpunkte entsprachen dem *in vivo* beschriebenen Transkriptionsinitiationsort in Mitochondrien aus *Oenothera*. Interessanterweise entsprachen im Fall von RpoTp nur etwa ein Drittel der RNA-5'-Enden dem exakten Startpunkt an Position -209, wogegen die übrigen Transkripte ein bis fünf Nukleotide stromauf- oder abwärts bzw. in einer AT-reichen Region 30 nt stromaufwärts des korrekten Initiationsortes lagen. Demnach waren zwar sowohl RpoTm als auch RpoTp *in vitro* in der Lage den angebotenen *PatpA*-Promotor korrekt zu transkribieren, RpoTp allerdings mit geringerer Präzision.

3.2.2 Expression eines mitochondrialen Promotors in Plastiden *in planta*

Nachdem der *in vitro* Beweis für die Transkription des *PatpA*-Promotors durch eine plastidäre RNAP vorlag, sollte die *in vivo* Erkennung dieses Promotors in Chloroplasten nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde ein chimäres Reportergenkonstrukt hergestellt, das die kodierende Region des Kanamycingens (*nptII*) unter Kontrolle des mitochondrialen Promotors *PatpA* beinhaltete (Abbildung 36). Um ein Mitochondrien-typisches Gen zu erzeugen, wurde zusätzlich stromabwärts des *nptII*-Gens das 3'-UTR des mitochondrialen *atp9*-Gens inseriert. 3'-UTRs sind im Allgemeinen sowohl in Plastiden als auch in Mitochondrien für die Ausbildung einer stabilen RNA-Sekundärstruktur verantwortlich, welche die RNA-Stabilität und Prozessierung des 3'-Endes gewährleistet.

Mit dieser chimären Mitochondrien-typischen *nptII*-Kassette wurden zwei Plastidentransformationsvektoren konstruiert. Der Vektor pSR7 enthält die *nptII*-Kassette in der gleichen transkriptionellen Orientierung wie das stromaufwärts liegende *trnfM* Gen und das stromabwärts liegende selektierbare Markergen *aadA*, das eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz verleiht. Da bei diesem Konstrukt die mRNA-Akkumulation zumindest teilweise durch eine Kotranskription des *trnfM*-Gens aufgrund unvollständiger Termination hervorgerufen werden könnte, wurde zusätzlich der Transformationsvektor pSR8 konstruiert, der die *nptII*-Kassette in umgekehrter Orientierung enthielt, wodurch eine Kotranskription mit anderen Genen ausgeschlossen werden sollte. Die Vektoren wurden in Tabak-Chloroplasten trans-

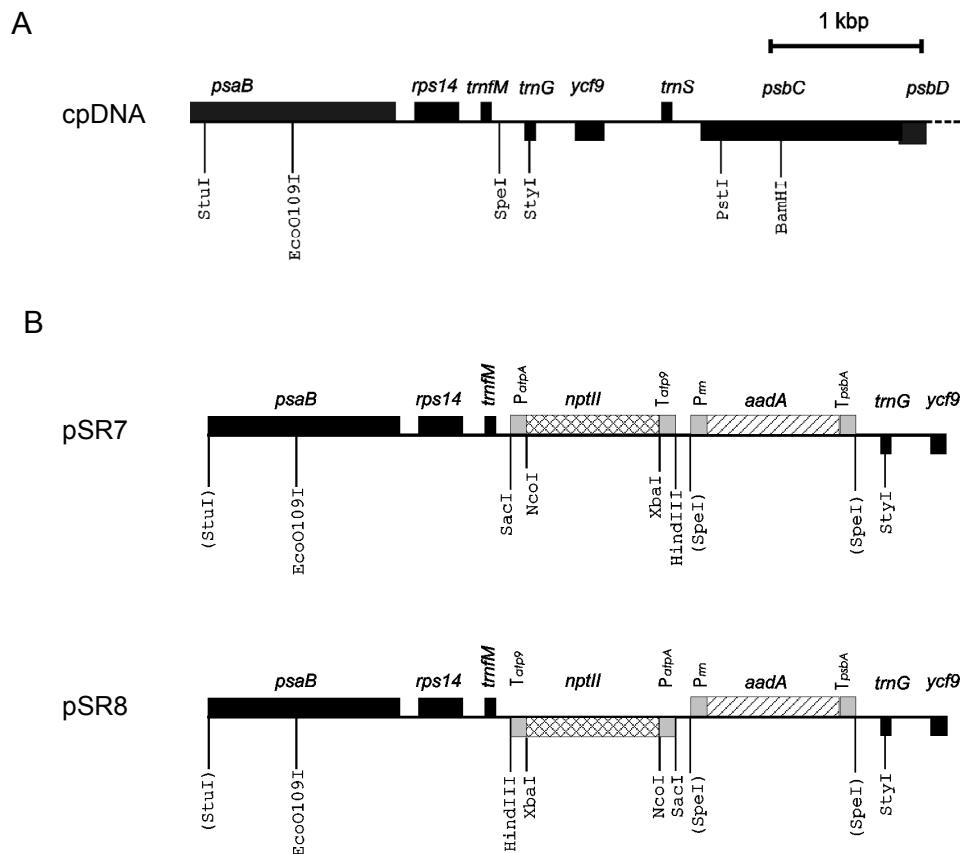


Abbildung 36: Plastiden-Transformationsvektoren für die Expression eines chimären *nptII*-Gens unter Kontrolle eines mitochondrialen Promotors. (A) Schematische Darstellung der Zielregion im plastidären Genom von *Nicotiana tabacum*. Gene sind durch schwarze horizontale Balken und den dazugehörigen Namen gekennzeichnet. Gene oberhalb der Linie zeigen eine Transkription von links nach rechts, unterhalb der Linie eine Transkription in umgekehrter Richtung an. Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung, RFLP-Analyse oder Generierung von Hybridisierungssonden verwendet wurden, sind angezeigt. (B) Plastiden-Transformationsvektoren pSR7 und pSR8 nach Integration in das plastidäre Genom. Die integrierten Gene sind durch gemusterte Balken dargestellt. Der selektierbare Marker für die Chloroplastentransformation, *aadA*, ist unter Kontrolle eines Plastiden-spezifischen Expressionssignals, wogegen die Transkription der Kanamycin-Resistenzkassette, *nptII*, mitochondrialen Expressionssignalen unterliegt. Beschriftung wie unter (A). *Prrn*: plastidärer *rRNA*-Operon Promotor [Svab und Maliga, 1993]; *TpsbA*: 3'UTR des plastidären *psbA*-Gens; *PatpA*: mitochondrialer *atpA* Promotor aus *Oe. berteriana*; *Tatp9*: 3'UTR des mitochondrialen *atp9*-Gens. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von S. Ruf, AG Bock).

formiert und mit Hilfe der erhaltenen Spectinomycin-/Streptomycin-Resistenz bis zur Homoplasmie selektiert. Die Integration des Transgens in den erhaltenen Mutanten wurde durch *Southern blot*-Analysen bestätigt [Bohne et al., 2007]. Des Weiteren zeigten die Mutanten eine geringfügig höhere Kanamycin-Resistenz als der Wildtyp und wiesen im *Northern blot* ein gering abundantes *nptII*-Transkript auf [Bohne et al., 2007]. Die Konstruktion der Transformationsvektoren, die Erzeugung der Mutanten sowie die bisher beschriebenen Mutantenanalysen wurden von Dr. S. Ruf (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie,

Potsdam-Golm) durchgeführt. Die Transformationsvektoren als auch die damit durch Plastidentransformation erzeugten homoplastomischen *Nicotiana tabacum*-Mutanten, SR7 und SR8, wurden von S. Ruf für die nachfolgend beschriebenen Analysen zur Verfügung gestellt. Die gegenüber dem Wildtyp geringfügig höhere Kanamycin-Resistenz der transplastomen Tabak-Mutanten implizierte eine Expression der Plastom-integrierten *nptII*-Kassette unter Kontrolle des mitochondrialen *PatpA*-Promotors. Es konnte bislang jedoch noch nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob das beobachtete monocistronische *nptII*-Transkript tatsächlich aus einer Transkriptionsinitiation an *PatpA*-209 resultiert oder möglicherweise ein Prozessierungsprodukt längerer Vorläufer-RNAs ist, deren Transkription an einem stromaufwärts gelegenen Plastidenpromotor initiiert wird. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, sollte das genaue 5'-Ende des *in vivo* synthetisierten *nptII*-Transkriptes bestimmt werden (Abbildung 37). Zur exakten Kartierung des Transkriptionsinitiationsortes wurde eine 5'-RACE-Technik verwendet, die es erlaubt zwischen primären und sekundären Transkriptenden zu unterscheiden (Kap. 2.2.3.8). Primäre 5'-Enden organellärer Transkripte tragen Triphosphate, wogegen prozessierte Transkripte ein Monophosphat am 5'-Ende aufweisen. Lediglich Letztere fungieren als Substrat der RNA-Ligase, wodurch die Ligation eines RNA-Adaptors durch dieses Enzym an primäre 5'-Enden erst nach enzymatischer Entfernung des 5'-Pyrophosphates (z. B. durch das Enzym *tobacco acid pyrophosphatase*, TAP) möglich ist. Demnach werden in der 5'-RACE TAP-behandelter RNAs sowohl für primäre als auch für sekundäre Transkripte Produkte erhalten, wogegen ohne vorherige TAP-Behandlung Produkte von primären Transkripten deutlich reduziert oder abwesend sind. Durch den Vergleich der 5'-RACE-Produkte TAP-behandelter und unbehandelter RNA (Abbildung 37 A, Spuren „+T“ und „-T“) wurde das 5'-Ende des primären *nptII*-Transkriptes in transplastomischen Pflanzen bestimmt. In der Tat stimmten die detektierten 5'-Enden exakt mit dem 5'-Ende des nativen, an *PatpA*-209 initiierten *atpA*-Transkriptes in Mitochondrien überein (Abbildung 37 B). Es ist hervorzuheben, dass im Gegensatz zu der Situation in den zuvor beschriebenen *in vitro*-Assays (Kap. 3.2.1) alle sequenzierten 5'-RACE-Produkte das korrekte 5'-Ende an Position -209 aufwiesen (Daten nicht gezeigt), was auf eine wesentlich genauere Erkennung dieses mitochondrialen Promotors durch eine der plastidären Phagentyp-RNA-Polymerasen *in vivo* schließen lässt. Die zur Kartierung des *in vivo* synthetisierten 5'-Endes verwendete TAP-RACE-Methode liefert zudem Hinweise darauf, dass das primäre *nptII*-Transkript nicht prozessiert wird, da in der -TAP-Reaktion, in der die für sekundäre Transkripte charakteristischen 5'-Monophosphat-Produkte amplifiziert werden, kein signifikantes Signal detektiert wird.

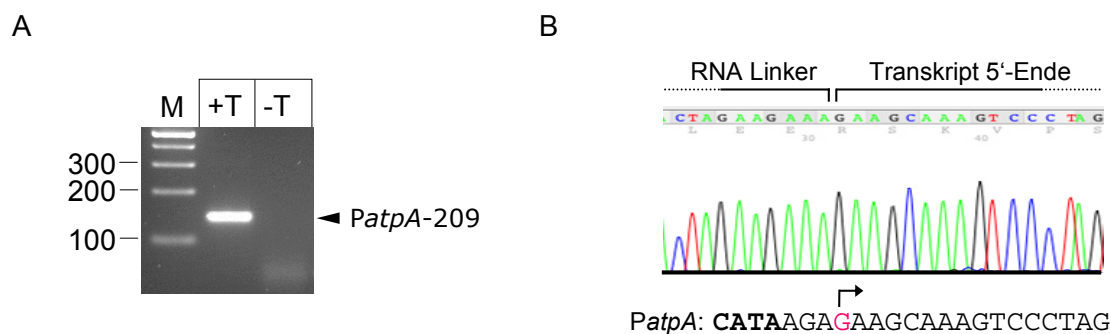


Abbildung 37: Korrekte Transkriptionsinitiation an einem mitochondrialen Promotor in transgenen Plastiden. (A) 5'-RACE-Analyse *in vivo* synthetisierter *nptII*-Transkripte (Kap. 2.2.3.8). Das TAP-spezifische RT-PCR-Produkt (+T), das mit dem 5'-Ende primärer *nptII*-Transkripte korrespondiert, ist durch eine Pfeilspitze und den dazugehörigen Promotornamen in Bezug auf die Translationsinitiationsstelle (+1) gekennzeichnet. Als Kontrolle diente ein paralleler 5'-RACE-Ansatz ohne TAP-Behandlung (-T). (B) Das Chromatogramm zeigt eine typische Sequenz der klonierten 5'-RACE-Produkte. Unterhalb des Chromatogramms ist die mitochondriale Promotorsequenz *PatpA* dargestellt. Beschriftung und Symbole wie in Abbildung 12.

Um die Stärke der Transkription vom *PatpA*-Promotor mit plastidären NEP-Promotoren und einem starken PEP-Promotor zu vergleichen, wurden *Run On*-Assays mit isolierten Chloroplasten der SR7 und SR8-Mutanten durchgeführt (Kap. 2.2.4). Die neusynthetisierten [α - 32 P]-UTP markierten RNAs wurden mit auf einem Filter aufgebrachten Sequenzen des *nptII*-Gens und den Sequenzen der plastidären NEP-transkribierten Gene *rpoB* und *clpP* und des PEP-transkribierten *psbA*-Gens hybridisiert (Abbildung 38). Das Experiment bestätigte die aktive Transkription des *nptII*-Gens in den transplastomischen Linien SR7 und SR8. Wie erwartet zeigten die als Kontrolle mitgeführten *Run On*-Transkripte aus Wildtyp-Chloroplasten („WT“) keine Hybridisierung mit der *nptII*-Sequenz auf dem Filter, wogegen die aus den Mutanten („SR7“, „SR8“) isolierten Transkripte deutliche Signale lieferten. Der *PatpA*-209-Promotor wurde hierbei weniger aktiv transkribiert als der starke *psbA*-PEP-Promotor, was früher gefundenen Daten entspricht, die zeigten, dass in grünem Gewebe die transkriptionelle Aktivität der PEP wesentlich stärker ist als die der NEP. Dagegen waren die Hybridisierungssignale für das *nptII*-Transkript aus den Mutanten verglichen mit den Signalen für die Chloroplasten-eigenen NEP-Gene *rpoB* und *clpP* deutlich stärker, wodurch sich eine effizientere Nutzung des mitochondrialen Promotors als der beiden untersuchten NEP-Promotoren andeutet. Die hier durchgeführten Experimente belegen eindeutig die korrekte *in planta*-Transkription des mitochondrialen *PatpA*-Promotors durch das plastidäre Transkriptionssystem. Welche RNA-Polymerase für die Transkription verantwortlich ist, lässt

sich aus den erhaltenen Daten nicht zweifelsfrei ableiten. Es kann jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass die Transkription durch RpoTp erfolgt, da der *PatpA*-Promotor bereits *in vitro* durch dieses Enzym, nicht aber durch RpoTmp erkannt wurde.

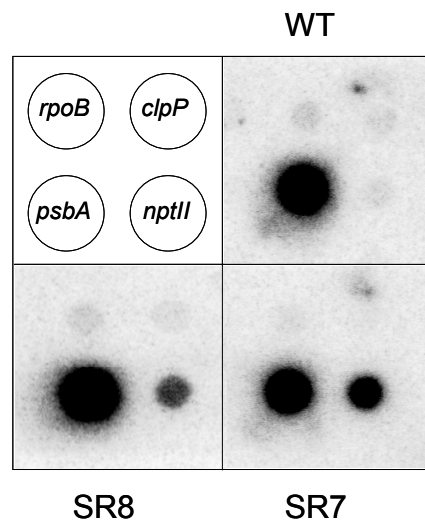


Abbildung 38: Detektion neusynthetisierter *nptII*-Transkripte in isolierten transgenen Plastiden (Kap. 2.2.4). Das Auftragsschema und *dot-blot*-Autoradiogramme von Chloroplasten-*Run On*-Experimenten sind dargestellt. Es wurden isolierte Chloroplasten 4-Wochen alter transplastomer (SR7/SR8) oder Wildtyp (WT) -Pflanzen untersucht. Die transkriptionelle Aktivität des mitochondrialen *PatpA*-Promotors, der die Expression des chimären *nptII*-Gens kontrolliert, wurde mit der repräsentativer plastidärer Gene (*rpoB*, *clpP*, *psbA*) verglichen.

4 DISKUSSION

4.1 Transkriptionelle Rollen der organellären Phagentyp-RNA-Polymerasen in *Arabidopsis thaliana*

4.1.1 Intrinsische Promotorspezifität von RpoTm und RpoTp

Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische RNA-Polymerasen benötigen Transkriptionsfaktoren für die Promotorerkennung. Im Gegensatz dazu ist die Erkennung von Promotorsequenzen eine intrinsische Fähigkeit der aus einem einzelnen Polypeptid bestehenden T7-RNA-Polymerase [Übersicht in Cheetham und Steitz, 2000]. Diese bemerkenswerte Eigenschaft könnte sich während der Evolution der organellären Phagentyp-RNAPs aus dem einstigen Bakteriophagen-Enzym erhalten haben. Die mitochondriale RNAP aus der Hefe ist *in vitro* in der Lage, Promotoren auf superhelikalen oder voraufgeschmolzenen Matrizen ohne zusätzliche Transkriptionsfaktoren zu erkennen [Matsunaga und Jaehning, 2004]. Dennoch ist für das Hefeenzym bekannt, dass *in vivo* Kofaktoren an der mitochondrialen Transkription beteiligt sind (vgl. Kap. 1.2.4.2).

Es wurden *in vitro*-Transkriptionsstudien zur Untersuchung der Fähigkeit der mitochondrialen Phagentyp-RNA-Polymerase RpoTm, der plastidären RpoTp und dual lokalisierten RpoTmp organelläre Promotoren von superhelikalen und linearen Matrizen zu transkribieren, durchgeführt. Es zeigte sich, dass keine der rekombinanten RNA-Polymerasen zur spezifischen Transkription der angebotenen Promotoren auf linearen Matrizen in der Lage war (Abbildungen 9-11, 13 und 15). In diesem Punkt unterscheiden sich die untersuchten Phagentyp-Enzyme von der T7-RNA-Polymerase, die die Fähigkeit zur spezifischen Transkription von linearen und zirkulären DNA-Matrizen besitzt [Portugal und Rodriguez-Campos, 1996].

Während RpoTmp auch bei Angebot superhelikaler Promotormatrizen lediglich eine geringe, kaum signifikante Präferenz für die mitochondrialen Promotoren *Patp6-1-200*, *Patp6-2-436*, *Patp6-2-507* und *Patp6-1-916/913* zeigte, konnte interessanterweise für RpoTm und RpoTp die spezifische Transkription einer überlappenden Gruppe mitochondrialer und plastidärer Promotoren detektiert werden (Abbildungen 9-11, 13 und 15, Tabelle 13). Die Bestimmung der exakten 5'-Enden der durch RpoTm und RpoTp *in vitro* synthetisierten Transkripte (Abbildungen 12, 14, 16; Tabelle 13, Kühn 2005) korrespondierte meist exakt mit den *in vivo* kartierten Initiationsorten primärer Transkripte aus *Arabidopsis* [Kühn et al., 2005; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007].

Tabelle 13: Erkennung organellärer Promotoren durch RpoTm, RpoTmp und RpoTp *in vitro*.

Gen	Promotor	Sequenz	RpoTm	RpoTmp	RpoTp
Mitochondriale Promotoren:					
<i>rrn18</i>	<i>Prn18-156</i>	tagaataatac cg <u>tatat</u> Aatcagaa	+	-	+
<i>atp6-1</i>	<i>Patp6-1-200</i>	gccataatac cg <u>tatat</u> Aagaagag	+	-	+
<i>atp9</i>	<i>Patp9-295</i>	ctggtgctct cg <u>tatat</u> Aagagaag	+	-	-
<i>atp1</i>	<i>Patp1-1947</i>	ctggtggtat cg <u>tatat</u> Aagagaga	+	-	+
<i>cox2</i>	<i>Pcox2-210</i>	atgttggttt cg <u>tatat</u> Aagaagac	+	-	+
<i>tRNA-fMet</i>	<i>PtrnM-98</i>	tttgaaatat cg <u>taaga</u> Gaagaagg	+	-	+
<i>rrn26</i>	<i>Prn26-893</i>	ctatcaatttc ata agaGaagaaag	+	-	+
<i>atp1</i>	<i>Patp1-1898</i>	ctatcaatttc ata agaGaagaaag	+	-	+
<i>atp9</i>	<i>Patp9-239</i>	ctatcaatttc ata agagaagacga	-	-	-
<i>atp6-1</i>	<i>Patp6-1-156</i>	ctatcaatct ata agagaagaaat	(+) ^d	-	(+) ^d
<i>atp8</i>	<i>Patp8-157</i>	ctatcaatct ata agaGaaGaaat	(+) ^b	-	-
<i>atp8</i>	<i>Patp8-228/226</i>	cataccataac ata tatAgaatcga	+	-	+
<i>rrn18</i>	<i>Prn18-69</i>	agtgggaattg aa taagagaagaaag	-	-	-
<i>atp6-1</i>	<i>Patp6-1-916/913</i>	agcccttttat att <u>tatat</u> AatAaagc	+	+	+
<i>cox2</i>	<i>Pcox2-481</i>	atgaatattc att agatAataGatt	+	-	-
<i>rps3</i>	<i>Prps3-1133</i>	tagaaaaaatt att agtaaatcgt	-	-	n.b.
<i>rps3</i>	<i>Prps3-1053</i>	ttttttattt gg taggtaacatcgc	-	-	n.b.
<i>atp9</i>	<i>Patp9-487</i>	atgtcttatt gg tatgtGatacaag	+	-	+
<i>atp9</i>	<i>Patp9-652</i>	agaagattg aag taaggagcaggtt	-	-	-
<i>cox2</i>	<i>P*cox2-345^a</i>	tctgtactgt ag taataGaagagtc	+	-	+
<i>atp6-2</i>	<i>Patp6-2-436</i>	tcttgaatt aag <u>tata</u> tGaaaaga	+	+	+
<i>atp6-2</i>	<i>Patp6-2-507</i>	gataaatt aag tatagtaaatAagaa	+	+	+
<i>tRNA-fMet</i>	<i>PtrnM-574/573</i>	ctaatttatataaaaaagaccggga	-	-	n.b.
<i>trnY/E</i>	Intern?	tRNA-Gen	-	-	-
<i>trnS</i>	Intern?	tRNA-Gen	-	-	-
<i>trnK</i>	Intern?	tRNA-Gen	-	-	-
Plastidäre Promotoren:					
<i>ycf1</i>	<i>Pycf1-39</i>	taaaatcat ata taatAatccaga	+	-	+
<i>ycf1</i>	<i>Pycf1-104</i>	gtgtcattgac ata agaGatgtcgt	(+) ^d	-	(+) ^d
<i>rpoB</i>	<i>PrpoB-300</i>	tatgtaatat ata gggtgaaaatga	-	-	-
<i>accD</i>	<i>PaccD-252</i>	ttcttatatt ata agcgaagaaca	-	-	-
<i>accD</i>	<i>PaccD-172</i>	catttagaattaaaattgattcatt	-	-	-
<i>rps4</i>	<i>Prps4-151</i>	ttatatatat tg <u>tata</u> tcaataaa	-	-	-
<i>rps15</i>	<i>Prps15-139</i>	ctttttgagat ct aaatttagattt	-	-	-
<i>atpB</i>	<i>PatpB-318</i>	aataatgaat ata actaaagttcc	-	-	-
<i>trnG (UCC)</i>	<i>PtrnG-15/13</i>	aaggttaatt tata tGcAataattg	(+) ^c	-	+
<i>clpP</i>	<i>PclpP-58</i>	caattttacgtttccacatcaaagtgaat	-	-	-
<i>rrn16</i>	<i>Prn16-139</i>	gtgggattgacgtgagggggtaggg	-	-	-
<i>trnE (UUC)</i>	Intern?	tRNA-Gen	-	-	-
<i>trnM (CAU)</i>	Intern?	tRNA-Gen	-	-	-
<i>trnT (GGU)</i>	Intern?	tRNA-Gen	-	-	-

Die Präferenz der rekombinanten Enzyme RpoTm, RpoTmp und RpoTp für organelläre Promotoren gegenüber zufälligen Transkriptionsinitiationsorten ist durch ein plus angezeigt. Promotorkernsequenzen sind fett gedruckt und das gehäuft auftretende Sequenzmotiv TATATA(A) ist grau hervorgehoben. Zuvor *in vivo* bestimmte Transkriptionsinitiationsorte [Prn18-69: Giese et al., 1996; Kühn et al., 2005; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007] sind in der Sequenz unterstrichen, *in vitro* durch 5'-RACE detektierte Initiationsnukleotide groß geschrieben. Grau geschriebene Ergebnisse wurden erstmals von Kühn [2005] gezeigt. ^aDie Initiation am Promotor P*cox2-345 wurde *in vivo* nicht beobachtet und ist wahrscheinlich ein *in vitro* Artefakt. ^bDie Initiation an diesem Promotor wurde nur durch 5'-RACE der *in vitro* synthetisierten Transkripte detektiert. ^cDie Initiation am Promotor *PtrnG-15/13* durch RpoTm erfolgte an Position -17. ^dDie Initiation an diesem Promotor war erst bei Insertion kurzer Promotorsequenzen sichtbar (siehe Text). n. b.: nicht bestimmt.

Um einen Einfluss kontaminierender bakterieller Proteine auf die Transkription oder die transkriptionellen Eigenschaften der rekombinanten RpoTs im *in vitro*-Assay auszuschließen, wurden RpoTm und RpoTmp annähernd bis zur Homogenität aufgereinigt (Kap. 3.1.8, Abbildung 27 A). Die Fähigkeit zur Promotorerkennung durch RpoTm sowie die hohe unspezifische Aktivität von RpoTmp blieben auch in den hochreinen Präparationen erhalten (Abbildung 27 B). Obwohl Spuren kontaminierender *E. coli*-Proteine und somit ein Einfluss auf die Transkription nicht ausgeschlossen werden kann, ist diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich. Bislang liegen keine Daten vor, die eine von bakteriellen Proteinen abhängige Promotorerkennung durch Bakteriophagen- oder Phagentyp-Polymerasen belegen. Zwar stimulierte die Überexpression des bakteriellen Histon-ähnlichen Proteins HU in *E. coli* vermutlich durch eine Veränderung der DNA-Superhelikalität die Aktivität der T7-RNA-Polymerase [Morales et al., 2002], jedoch kann diese unspezifische Stimulation nicht für die hier beobachtete spezifische Promotorerkennung verantwortlich sein.

Auch kann eine Transkription der untersuchten Promotoren durch kontaminierende *E. coli*-RNAP weitestgehend ausgeschlossen werden, da im Gegensatz zu RpoTm und RpoTp durch die identisch aufgereinigten RpoTmp-Präparationen keine signifikante Erkennung organellärer Promotoren detektiert wurde. Hinzu kommt, dass kommerziell erworbenes *E. coli* Holoenzym in der Lage ist, *in vitro* plastidäre PEP-Promotoren (z. B. *PycfI*-33/34 und *PrrnI*6-112) zu erkennen, nicht aber NEP-Promotoren (vgl. Abbildung 30, Daten nicht gezeigt). Eine genaue Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von Promotormatrizen, die sowohl NEP als auch PEP-Promotoren aufweisen, wie z. B. der Vektor pKL23-*PycfI*, zeigte eine Erkennung des NEP-abhängigen Promotors *PycfI*-39 und nicht des stromabwärts liegenden PEP-Promotors *PycfI*-33/34 (vgl. Abbildung 13 und 14). Des Weiteren wurden die in dieser Arbeit untersuchten RNAP-Aktivitäten nicht durch den bakteriellen RNAP-Inhibitor Rifampicin gehemmt (vgl. Abbildung 30) und zeigten auch in Experimenten von K. Kühn ein Inhibitionsmuster, dass sich deutlich von dem der *E. coli* RNA-Polymerase unterschied [Kühn, 2001]. Bei der in den *in vitro*-Studien gesehenen Promotorspezifität von RpoTm und RpoTp scheint es sich demnach um eine intrinsische und Kofaktor-unabhängige Eigenschaft der RNA-Polymerasen zu handeln.

4.1.2 Selektive Promotorerkennung durch RpoTm und RpoTp

Die rekombinanten Enzyme RpoTm und RpoTp initiierten die spezifische Transkription von einer Vielzahl, wenn auch nicht von allen angebotenen Promotoren. Von den untersuchten mitochondrialen Promotoren wurden alle, die ein TATATA-Motiv beinhalten durch RpoTm *in*

vitro erkannt (vgl. Tabelle 13). In ähnlicher Weise stimulierte das Promotorkernmotiv CGTA die Transkription durch RpoTm, wobei *PtrnM*-98, der einzige dieser Promotoren, der zwar ein CGTA-, aber kein TATATA-Motiv aufweist, die Initiation weniger effizient stimulierte (Abbildung 10). Von den Promotoren mit einem CATAAGAGA-Nonanukleotidmotiv (*Prrn26*-893, *Patp1*-1898, *Patp9*-239 *Patp6-1*-156, *Patp8*-157) führten alle, mit Ausnahme des *Patp9*-239-Promotors zu deutlichen, aber gering abundanten Transkripten (Abbildungen 9-11, 19). Weder die *in vitro*-Transkriptionsstudien noch die Kartierung der Transkript-5'-Enden lieferten Hinweise auf eine spezifische Transkriptionsinitiation an *Patp9*-239 oder dem ähnlichen Promotor *Prrn18*-69. Interessanterweise konnte eine Initiation an *Patp6-1*-156 erst nach Integration einer lediglich die Nukleotide -27 bis +5 umfassenden Sequenz in den pKL23-Vektor, die eine Deletion des weiter stromaufwärts liegenden Promotors *Patp6-1*-200 mit sich brachte, detektiert werden (Abbildung 19). Ein ähnliches Phänomen wurde bei der Transkription des plastidären *Pycf1*-104-Promotors beobachtet (s. u.). Es könnte daher eine von der Promotorstärke abhängige Konkurrenz zweier auf einem Konstrukt liegender Promotoren um die RNA-Polymerase geben. Auch eine Deletion inhibitorisch wirkender Sequenzelemente außerhalb der Region von -27 bis +5 ist denkbar. Da trotz einer signifikanten Sequenzähnlichkeit der Promotoren *Patp9*-239, *Patp1*-1898, und *Patp6-1*-156, *Patp8*-157 und *Prrn26*-893 (vgl. Tabelle 13) lediglich *Patp9*-239 nicht durch RpoTm transkribiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass bereits kleinste Veränderungen der Promotorsequenz zu einer Nicht-Erkennung des Promotors führen. So weist der nicht-erkannte *Patp9*-239 Promotor beispielsweise im Gegensatz zu den genannten Promotoren an Position +6 ein Cytosin anstelle eines Adeninnukleotids auf. Promotormutagenese-Experimente könnten Aufschluss über die Relevanz dieser Nukleotidposition für die Transkriptionseffizienz durch RpoTm geben. Alternativ könnten Sequenzen außerhalb der 25 in der Tabelle 13 dargestellten Nukleotide die Promotorstärke *in vitro* bestimmen. Anhaltspunkte dafür geben die hier durchgeführten Untersuchungen zur Erkennung verkürzter Promotorsequenzen (Kap. 3.1.5.1, Abbildung 19): während für die meisten der untersuchten Promotoren die Sequenz von -27 bis +5 für eine effiziente Transkription durch RpoTm und RpoTp ausreichte, war an den zuvor bereits schwach transkribierten Promotoren *Pcox2*-481 und *Patp9*-487 mit den erst kürzlich beschriebenen Kernsequenzen ATTA bzw. GGTA (Tabelle 13, vgl. Abbildung 9 für *Pcox2*-481) im *in vitro*-Assay keine signifikante RNA-Synthese mehr detektierbar (Kap. 3.1.5.1). Neuere Untersuchungen der stromaufwärts des mitochondrialen *cox2*-Promotors gelegenen Region aus der Hefe wiesen einer über 200 bp vom Promotor entfernten Sequenz eine Relevanz in der Promotornutzung zu [Pfeuty et al., 2006]. Die Deletion dieser Region führte zu einem Abfall der

Transkriptmenge um etwa 50%. Auch für die T7-RNAP wurden Sequenzen stromaufwärts der für die Promotorerkennung essentiellen Region beschrieben, welche die Promotoraktivität beeinflussen [Tang et al., 2005]. Diese und die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Daten legen nahe, dass die Basenzusammensetzung stromaufwärts zumindest einiger mitochondrialen Promotoren die Expression der entsprechenden Gene moduliert. Eine detaillierte Deletionsanalyse der Arabidopsis-Promotoren *Pcox2-481* und *Patp9-487* könnte Aufschluss über die Identität solcher regulatorischen Sequenzen geben.

Erstaunlicherweise erkannte RpoTp, ein ausschließlich in den Plastiden lokalisiertes Enzym, nahezu alle ebenfalls von RpoTm transkribierten mitochondrialen Promotoren (Abbildung 9 und Abbildung 10). Dabei zeigte sich bei den sehr ähnlichen CGTA-Motiv-Promotoren *Patp6-1-200* und *Prrn18-156* sowie dem Promotor *Pcox2-481* eine deutlich ineffizientere Transkription durch RpoTp im Vergleich zu RpoTm, was auf eine Diversifikation von RpoTp bzw. RpoTm durch eine evolutionäre Adaptation an ihre nativen Promotoren hinweisen könnte.

Bei der Transkription plastidärer Promotoren erwiesen sich die Enzyme selektiver. Von den angebotenen plastidären NEP-Promotoren lieferte zunächst lediglich der *Pycf1-39* Typ Ib-Promotor spezifische RNA-Produkte durch RpoTp (Tabelle 13). Der gemeinsam mit *Pycf1-39* auf diesem pKL23-Konstrukt liegende *Pycf1-104* Typ Ia-Promotor erzeugte keine spezifischen Transkripte. Die Deletion des *Pycf1-39*-Promotors auf dem pKL23-Derivat führte wie für den *Patp6-1-156*-Promotor beschrieben (s. o.) zur Erkennung von *Pycf1-104* durch RpoTp (Abbildung 13 und 14). Ähnlich wie zuvor für die Erkennung mitochondrialer Promotoren durch RpoTp beschrieben (s. o.), war ebenfalls RpoTm zur spezifischen Transkription der von RpoTp erkannten plastidären Promotoren in der Lage (Abbildungen 13, 15 und 16).

Die begrenzte Fähigkeit von RpoTp zur Erkennung der untersuchten NEP-Promotoren könnte auf das Fehlen eines essentiellen Transkriptionsfaktors in den Versuchsansätzen hindeuten. Demgegenüber steht die intrinsische Fähigkeit von RpoTp zur Transkription diverser mitochondrialer Promotoren. Die erkannten NEP-Promotoren, *Pycf1-39* und *Pycf1-104*, weisen interessanterweise deutliche Ähnlichkeit zu den ebenfalls durch RpoTp und RpoTm erkannten mitochondrialen Promotoren *Patp8-228/226* bzw. Promotoren des konservierten Typs **CRTAAGAGA** auf (Tabelle 13, Kap. 1.2.3.2). Während viele mitochondriale Promotoren durch eine intrinsische Fähigkeit von RpoTm und RpoTp transkribiert werden, scheinen die meisten plastidären Promotoren, die notwendigen Informationen für eine Erkennung durch die

Phagentyp-RNA-Polymerasen verloren zu haben. RpoTp könnte sich zu einer stärker Kofaktor-abhängigen RNA-Polymerase als RpoTm entwickelt haben.

Neben den untersuchten mitochondrialen und plastidären Promotoren wurden verschiedene organelläre tRNA-Gene auf eine Transkription durch die RpoT-Enzyme an potentiellen internen Promotoren getestet (Kap. 3.1.4, vgl. Kap. 1.2.3.1). Keines der untersuchten tRNA-Gene (*cp-trnM*, *cp-trnE*, *cp-trnT*, *cp-trnG*, *mt-trnS*, *mt-trnY,E*) enthielt eine Sequenz, die *in vitro* als Promotor von RpoTm, RpoTp oder RpoTmp fungierte. Möglicherweise ist die Assoziation der NEP oder PEP mit distinkten Spezifitätsfaktoren für die Erkennung interner tRNA-Promotorstrukturen essentiell. Allerdings konnte eine unmittelbar vor der kodierenden Sequenz des *cp-trnG*-Gens liegende AT-reiche Region die Transkription durch die RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTm stimulieren (Abbildungen 15 und 16). Dieser zuvor *in vivo* in translationsinhibierten Arabidopsis-Plastiden kartierte Promotor (*PtrnG*-15/-13, Swiatecka-Hagenbruch, unveröffentlichte Daten) weist keinerlei Ähnlichkeit zu bislang bekannten Promotoren der Phagentyp RNA-Polymerasen auf (vgl. Sequenz in Tabelle 13). Transkriptanalysen aus Tabak und Senf belegen die Kotranskription des *trnG*-Gens mit den unmittelbar stromaufwärts liegenden Genen *psbK* und *psbI* an einem weit stromaufwärts von *trnG* gelegenen Promotor [Liere und Link, 1994; Meng et al., 1991]. Allerdings konnten sowohl in Tabak als auch in Senf zusätzliche Transkriptionsinitiationsorte stromaufwärts des *trnG*-Gens detektiert werden [Liere und Link, 1994; Meng et al., 1991]. Diese Ergebnisse sowie der hier *in vitro* bestätigte Arabidopsis-Promotor *PtrnG*-15 suggerieren eine differentielle Regulation der verschiedenen Promotoren. Diese Annahme wird durch die Detektion deutlich höherer *steady state trnG*-Transkriptmengen im Vergleich zu *psbK-psbI*-Transkripten unterstützt [Meng et al., 1991].

4.1.3 Unterschiedliche transkriptionelle Eigenschaften der Phagentyp-RNA-Polymerasen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen zu den transkriptionellen Eigenschaften der drei Arabidopsis RpoTs deuten auf eine Auseinanderentwicklung der Promotorspezifitäten von RpoTm, RpoTmp und RpoTp während der Evolution der Angiospermen hin. Wie die T7- oder Hefe-RNA-Polymerase sind RpoTm und RpoTp zur Erkennung organellärer Promotoren in der Lage (vgl. Kap. 4.1.1). Eine bestimmte Polypeptidregion in der mitochondrialen RNA-Polymerase der Hefe weist trotz einer geringen Konservierung der Primärsequenz deutliche strukturelle Ähnlichkeit mit der promotorbindenden Spezifitätsschleife (*specificity loop*) des T7-Enzyms auf [Matsunaga und Jaehning, 2004]. Entsprechende Strukturen könnten auch von den RpoT-Enzymen ausgebildet werden und die intrinsi-

sche Fähigkeit zur Erkennung diverser Promotoren unterschiedlicher Architektur hervorrufen. Allerdings transkribieren die Phagentyp-RNAPs trotz signifikanter struktureller und funktionaler Ähnlichkeiten zu der T7-RNAP [McAllister und Raskin, 1993; Sousa et al., 1993], im Gegensatz zu dieser keine Promotoren von linearen Matrizen und scheinen *in vivo* Kofaktoren für die Promotoraufschmelzung und möglicherweise -erkennung zu benötigen (vgl. Kap. 4.2.2).

Von RpoTp und RpoTmp wird angenommen, dass sie durch Duplikationen des Gens für die mitochondriale RNAP entstanden sind [Hedtke et al., 2000]. Obwohl die Divergenz von RpoTmp und RpoTm vermutlich zu einem späteren Zeitpunkt stattgefunden hat als diejenige von RpoTm und RpoTp [Azevedo et al., 2006; Emanuel et al., 2004], hat RpoTmp die Fähigkeit zur Promotorerkennung nahezu verloren und zeigte lediglich eine sehr hohe jedoch vorwiegend unspezifische transkriptionelle Aktivität. RpoTp dagegen hat die intrinsische Fähigkeit zur Erkennung mitochondrialer Promotoren während der Evolution zu einer plastidären Transkriptase beibehalten.

Unterschiedliche RNA-Syntheseraten und Promotorspezifitäten deuten möglicherweise auf verschiedene *in vivo*-Funktionen von RpoTm und RpoTmp in den Mitochondrien bzw. RpoTp und RpoTmp in den Plastiden hin, könnten aber auch auf einem unterschiedlichen Effekt des N-terminal fusionierten Thioredoxin-tags beruhen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die RNA-Polymerasen mit Hilfe des pCOLD-Systems exprimiert (Kap. 2.2.5.1.2.2). Die Expression von RpoTm, RpoTp und RpoTmp ohne einen Thioredoxin-tag hatte jedoch keinen Einfluss auf ihre transkriptionellen Eigenschaften (Daten nicht gezeigt).

Während die vorliegenden Daten sowohl RpoTm als auch RpoTp eine Funktion in der Transkription mitochondrialer bzw. plastidärer Gene zuschreiben, stellt die transkriptionelle Rolle sowie die Lokalisierung von RpoTmp noch immer ein Diskussionsthema dar [Azevedo et al., 2006; Kabeya und Sato, 2005]. Obwohl für RpoTmp *in vitro* keine spezifische Transkription organellärer Promotoren gezeigt werden konnte, sprechen einige Daten für eine Funktion von RpoTmp als Transkriptase plastidärer und mitochondrialer Gene: Die von Courtois et al. [2007] und Swiatecka-Hagenbruch et al. [2008] durchgeführten *primer extension*-Analysen einer RpoTmp-Mutante deuten auf die Transkription des plastidären *Prn16-139* (Pc)-Promotors durch RpoTmp hin. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Transkription des *PclpP*-Nichtkonsensustyp-Promotors: In RpoTp-überexprimierenden Tabakpflanzen, zeigte der *PclpP*-53-Promotor keine veränderte Nutzung [Liere et al., 2004], wogegen in RpoTmp-überexprimierenden Arabidopsispflanzen ein Anstieg der Transkription dieses Promotors (At-*PclpP*-58) detektiert wurde [Swiatecka, 2004]. Makroarray-Analysen der orga-

nellären Genexpression einer Arabidopsis RpoTmp-Mutante zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Expression einiger plastidärer sowie des mitochondrialen *atp1*-Gens [Baba et al., 2004]. Vor allem auf der Beobachtung basierend, dass in der RpoTmp-Mutante die Induktion einiger plastidärer Gene dunkel-gewachsener Keimlinge nach Beleuchtung im Vergleich zum Wildtyp verzögert war, gehen die Autoren von einer Schlüsselrolle von RpoTmp in der Transkription organellärer Gene während der frühen Keimlingsentwicklung aus, wogegen RpoTm und RpoTp eine Funktion in einem späteren Entwicklungsstadium zukommen könnte. Allerdings konnten Baba et al. [2004] zudem eine veränderte mRNA-Akkumulation der anderen beiden RpoT-Enzyme in der RpoTmp-Mutante zeigen, so dass die gesehenen Effekte ebenfalls auf veränderten Transkriptionsraten von RpoTm und RpoTp beruhen könnten. Gestützt wird diese Überlegung dadurch, dass die *atp1*-Promotoren *Patp1*-1947 und *Patp1*-1898 in *in vitro*-Assays keine spezifischen Transkripte durch RpoTmp lieferten (Abbildung 11 und 12). Dagegen transkribierte RpoTm beide *Patp1*-Promotoren mit hoher Effizienz. Dennoch besteht die Möglichkeit einer Kofaktor-vermittelten Transkription durch RpoTmp, da ebenfalls der von Courtois et al. [2007] und Swiatecka-Hagenbruch et al. [2008] als RpoTmp-abhängige *Prrn16*-139-Pc-Promotor sowie der *PclpP*-58-Promotor in den *in vitro*-Transkriptionen nicht spezifisch durch RpoTmp transkribiert wurden.

Da RpoTm und RpoTp diverse organelläre Promotoren in den *in vitro*-Assay erkannt haben, ist es unwahrscheinlich, dass das scheinbare Fehlen der Spezifität von RpoTmp lediglich auf der Abwesenheit eines Spezifitätsfaktors in den Versuchsansätzen beruht, der bei Anwesenheit zur Erkennung der bereits von RpoTm bzw. RpoTp transkribierten Promotoren führen würde. Womöglich beruht die schwache Erkennung der mitochondrialen Promotoren *Patp6-1*-200, *Patp6-2*-436, *Patp6-2*-507 und *Patp6-1*-916/913 durch RpoTmp lediglich auf konservierten strukturellen Elementen der Phagentyp-RNAPs. Dennoch ist es denkbar, dass Protein-Kofaktoren *in vivo* zu einer RpoTmp-abhängigen Transkription bislang *in vitro* nicht erkannter bzw. nicht untersuchter Promotoren führen könnten. Unterstützt wird diese Überlegung durch die kürzlich publizierte Studie von RpoTp-, RpoTmp- und RpoTp/Tmp-Mutanten, die auf redundante Funktionen von RpoTp und RpoTmp in der Pflanzenentwicklung hin deutet [Hricová et al., 2006]. Analysen der Promotoraktivität in dieser RpoTp-Mutante zeigten zudem eine nahezu unveränderte Nutzung NEP-abhängiger Promotoren [Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008]. Eine Ausnahme bildete der starke NEP-Promotor *Pycf1*-39 des essentiellen *ycf1*-Gens, der in der RpoTp-Mutante nicht aktiv war. Interessanterweise handelt es sich bei diesem Promotor um einen der wenigen plastidären Promotoren für den RpoTp *in vitro* eine intrinsische Fähigkeit zur Erkennung und Transkription zeigte (Abbildung 13). Diese Daten

suggestieren überlappende sowie genspezifische Funktionen von RpoTp und RpoTmp in der plastidären Genexpression.

Es ist ebenfalls eine Funktion von RpoTmp vorstellbar, die nicht in der Transkription organelärer Gene liegt. Für die mitochondrialen RNAPs aus dem Menschen sowie aus der Hefe ist sowohl eine Funktion in der Transkription mitochondrialer Gene als auch in der DNA-Replikation beschrieben [Übersicht in Lecrenier und Foury, 2000]. Obwohl die transkriptionelle Eigenschaft der RpoTmp zur Synthese besonders langer Transkripte nicht auf eine Rolle als Primase in der Replikation mitochondrialer oder plastidärer DNA hindeutet, kann eine RpoTmp vermittelte Initiation der Replikation an noch unbestimmten oder zufälligen Sequenzen nicht ausgeschlossen werden.

Interessanterweise scheinen die rekombinanten RpoTs eine zusätzliche RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität zu besitzen (Kap. 3.1.12), die ebenfalls für die T7-RNAP beschrieben wurde [Arnaud-Barbe et al., 1998; Biebricher und Luce, 1996; Konarska und Sharp, 1989; Konarska und Sharp, 1990]. Ob diese *in vitro* beobachtete Fähigkeit eine tatsächliche Relevanz in pflanzlichen Organellen hat, ist ungeklärt. In Mais-Mitochondrien konnte die DNA-unabhängige Replikation vererbbarer RNA-Plasmide gezeigt werden [Formanova und Brown, 1997]. Auch eine nicht-kodierte Extension verschiedener mitochondrialer und plastidärer Transkript-3'-Enden wurde beobachtet [Zanduetta-Criado und Bock, 2004], deren funktionale Bedeutung jedoch unbekannt ist. Es liegen derzeit keine Hinweise darauf vor, welche enzymatischen Aktivitäten die genannten Beobachtungen hervorrufen, so dass eine Partizipation von RpoTmp an den in den Studien beschriebenen RNA-Synthesen oder an der Synthese regulatorischer RNAs denkbar ist.

Möglicherweise spiegelt die *in vitro* beobachtete hohe unspezifische Aktivität und Synthese langer Transkripte durch RpoTmp auch eine tatsächliche *in vivo*-Funktion des Enzyms wider. Es könnte spekuliert werden, dass RpoTmp besonders früh in der Organellenentwicklung durch Kofaktor-vermittelte genspezifische, aber auch unspezifische Initiation basale Transkriptmengen einer Vielzahl von Genen gewährleistet, deren Abundanz nachfolgend posttranskriptionell reguliert wird [Übersicht in Del Campo, 2009; Forner et al., 2007; Giegé et al., 2000]. Neben dem Auftreten multipler Promotoren verschiedener Architektur in den Mitochondrien und Chloroplasten und möglicherweise fehlender Terminationssignale (vgl. Kap. 3.1.10; Forner et al. 2007) könnte dies trotz häufig auftretender Genomumordnungen bzw. homologer Rekombinationsereignisse eine sichere Genexpression ermöglichen. Eine unspezifische Transkription der organellären Genome könnte zudem teilweise eine Erklärung für das Auftreten langer nicht-kodierender, intergenischer und antisense-Transkripte darstellen

[Finnegan und Brown, 1990; Johnson et al., 2005], deren Expression vermutlich durch RNA-Degradationsmechanismen kompensiert wird. Auch Holec et al. [2006] detektierten in transgenen Arabidopsismutanten, die eine Runterregulierung der mitochondrialen Polynukleotidphosphorylase (PNPase) aufweisen, unter den RNAs, die durch Polyadenylierung für eine Degradation durch die PNPase markiert waren, Transkripte aus Regionen, die keine bekannten funktionalen Gene beinhalten. Diese Transkripte, die chimäre ORFs und *antisense*-Transkripte funktionaler Gene umfassten, zeigten eine deutliche Akkumulation in der Mutante und waren im Wildtyp nur durch sensitive PCR-Techniken nachweisbar [Holec et al., 2006]. Die Akkumulation dieser unter Umständen nachteiligen Transkripte könnte in mtPNPase-reduzierten Pflanzen zu den von Perrin et al. [2004] beobachteten Entwicklungsdefekten führen.

4.2 Regulation der Aktivität pflanzlicher Phagentyp-RNA-Polymerasen

4.2.1 Variable *in vitro*-Transkriptionsraten mitochondrialer Promotoren werden durch die Promotorstärke bestimmt

Die *in vitro*-Transkriptionsraten mitochondrialer Promotoren könnten erheblich durch die Promotorstärke bestimmt werden. *Run On*-Experimente von Mulligan et al. [1991] und Finnegan und Brown [1990] deuteten bereits auf von der Promotorstärke abhängige Transkriptionsraten mitochondrialer Gene in Pflanzen hin (vgl. Kap. 1.2.5). Auch die hier durchgeführten *in vitro* Studien geben aufgrund unterschiedlich effizient durch RpoTm transkribierter mitochondrialer Promotoren Hinweise auf einen derartigen Regulationsmechanismus (Kap. 3.1.2, vgl. auch Kap. 4.1.2).

Funktionale *in vitro*-Transkriptionsstudien zeigten, dass für die meisten der untersuchten Promotoren die Sequenz von -27 bis +5 (bezogen auf die Transkriptionsinitiation) für eine effiziente Transkription durch RpoTm und RpoTp ausreichte (Abbildung 17 und 19, vgl. auch Kap. 4.1.2). Dies ist weitestgehend in Übereinstimmung mit denen aus *in vitro*-Transkriptionsassays mit mitochondrialen Extrakten verschiedener Organismen erlangten Daten, die präsentierten, dass die Sequenzen von -12 bis +5 [Mais Patp1, Rapp et al., 1993; Rapp und Stern, 1992], -14 bis +4 [Erbse Patp9, Binder et al., 1995] und -17 bis +9 bp [Mais Pcox3, Caoile und Stern, 1997] für eine volle Promotoraktivität essentiell sind.

Darüber hinaus konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse mutagenisierter Promotoren bestimmten Elementen innerhalb der Sequenz von -27 bis +5 eine funktionale Relevanz zugewiesen werden (Kap. 3.1.5.2). So konnte demonstriert werden, dass sowohl RpoTm als auch RpoTp mit dem in vielen mitochondrialen und plastidären NEP-

Promotoren vorkommenden konservierten YRTA-Motiv direkt und spezifisch interagieren. Der Austausch nur zweier Nukleotide dieses Kernmotivs im sehr effizient erkannten *Patp8-228/226*-Promotor führte zu einem drastischen Verlust der Promotornutzung durch beide Enzyme (Abbildung 20). Besonders eine Substitution der Nukleotide an den Positionen 3 und 4 des YRTA-Motivs hatte drastische Auswirkungen auf die Transkriptionsrate.

Bei Promotoren mit einer AGTA-Kernsequenz, wie dem *Patp6-2-436*-Promotor, scheint es sich eher um ein durch RpoTm schwach erkanntes Motiv zu handeln. Die durch eine A nach C-Substitution erzielte Generierung eines typischen YRTA-Motivs in der *Patp6-2-436*-Promotorkernsequenz verstärkte dessen Transkription dagegen signifikant (Abbildung 21), was die Bedeutung des YRTA-Motivs für eine effiziente Promotortranskription unterstreicht.

Die funktionalen *in vitro*-Studien bestätigten nicht nur die Relevanz des konservierten YRTA-Promotorkernmotivs, sondern identifizierten darüber hinaus ein weiteres transkriptionsstimulierendes Element stromabwärts dieses Motivs. Das in allen durch RpoTm erkannten mt-Promotoren auftretende TATATA(A)-Motiv scheint bei Anwesenheit zu einem deutlichen Anstieg der Transkriptionseffizienz zu führen. Wird dieses Motiv gegen das in schwach erkannten mt-Promotoren (z. B. *Patp6-1-156*) an gleicher Position im Bezug zur Transkriptionsinitiation auftretende AAGAGA-Motiv ausgetauscht, kommt es zu einer drastischen Abnahme der Transkriptionsrate (Abbildung 22). In umgekehrter Weise erhöhte die Substitution AAGAGA-Motivs im *Patp6-1-156*-Promotor gegen das TATATA(A)-Motiv die spezifische RNA-Synthese durch RpoTm und RpoTp (Abbildung 23). Ob in dem untersuchten TATATA-Motiv essentielle, direkt mit der RNA-Polymerase interagierende Nukleotide vorliegen oder sich diese AT-reiche Sequenz lediglich bei der Initiation leichter durch das Enzym aufschmelzen lässt, bedarf weiterer Analysen. Der Austausch der AT-reichen Sequenz von einem auf den anderen DNA-Strang innerhalb der Promotormatrize könnte Aufschluss darüber geben.

Mutageneseexperimente mitochondrialer Hefepromotoren legen ebenfalls eine Regulation der mitochondrialen Genexpression durch die Promotorstärke nahe [Biswas, 1999; Biswas und Getz, 1986]. Die *in vitro* beobachtete Promotorstärke korrelierte hierbei mit *in vivo* detektierten *steady state* Transkriptmengen [Mueller und Getz, 1986]. Demnach scheinen die Promotorerkennung und -nutzung durch die Hefe-RNAP Rpo41 die Hauptdeterminanten der Transkriptabundanz zu sein. Darüber hinaus scheinen die Promotoren durch die Identität der Nukleotide in der Transkriptionsinitiationsregion in Abhängigkeit vom ATP-Gehalt der Zelle transkribiert zu werden, wodurch eine direkte Verbindung zwischen der mitochondrialen Genexpression und dem metabolischen Status des Organells bzw. der Zelle gewährleistet wird.

[Amiott und Jaehning, 2006; Amiott und Jaehning, 2006]. Ob in pflanzlichen Mitochondrien ähnliche Regulationsmechanismen vorkommen, ist unbekannt. Mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vitro*-Transkriptionssystems ließe sich ein Einfluss variabler NTP-Mengen auf die Promotornutzung durch RpoTm untersuchen.

Inwieweit die Transkriptionsraten plastidärer NEP-abhängiger Gene über die Promotorstärke reguliert werden, lässt sich von den hier durchgeführten *in vitro*-Experimente kaum ableiten, da die Anzahl der durch RpoTp erkannten Promotoren sehr gering war. Ein Vergleich Promotorstruktur-bestimmter Transkriptionseffizienzen wird zudem durch die begrenzte Anzahl kartierter NEP-Promotoren aus Arabidopsis und eine hohe Variabilität der Nukleotide um das Promotorkernmotiv erschwert. Obwohl sich gewisse Hinweise auf variable Promotorstärken aus der deutlich effizienteren *in vitro*-Transkription von *Pycf1*-39 gegenüber dem *Pycf1*-104-Promotor (vgl. Kap. 4.1.2) sowie aus variablen RpoTp-Transkriptionsraten mutagenisierter mitochondrialer Promotoren ergeben (s. o.), scheint eine Regulation der NEP-Aktivität über eine differentielle Aktivierung der Promotorspezifität-vermittelnden Faktoren wahrscheinlicher (vgl. Kap. 4.2.2, 4.2.3).

4.2.2 RpoTs benötigen zusätzliche Transkriptionsfaktoren *in vivo*

Von der Hefe-RNAP Rpo41 konnte kürzlich die intrinsische Fähigkeit zur Erkennung mitochondrialer Promotoren auf superhelikalen oder voraufgeschmolzenen DNA-Matrizen in Abwesenheit des akzessorischen Faktors sc-mtTFB beobachtet werden [Matsunaga und Jaehning, 2004]. Bei *in vitro*-Transkription voraufgeschmolzener Matrizen durch Rpo41 erhöhte die Zugabe von sc-mtTFB die Synthese abortiver RNA-Produkte, so dass dieser Faktor vermutlich eher eine Rolle für die Stabilisierung des offenen Promotorkomplexes und bei der Freisetzung der RNAP von der Promotorsequenz zum Übergang in die Elongationsphase spielt als die Promotorerkennung zu unterstützen.

In Übereinstimmung mit der intrinsischen Promotorspezifität des Hefeenzym zeigte die *in vitro*-Transkriptionsstudien für RpoTm und RpoTp ebenfalls eine intrinsische Fähigkeit zur spezifischen Transkription diverser organellärer Promotoren auf superhelikalen Matrizen, die einzig durch die katalytische Komponente vermittelt wurde und keiner zusätzlichen Proteinfaktoren bedurfte (Kap. 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4). RpoTm nutzte viele, aber nicht alle der angebotenen mitochondrialen Promotoren und unterschied sich von komplexen mitochondrialen Extrakten aus Pflanzen durch die Unfähigkeit zur spezifischen Transkription von Promotoren auf linearen Matrizen [Binder et al., 1995; Hanic-Joyce und Gray, 1991; Rapp und Stern, 1992]. In Anbetracht der Tatsache, dass in der Pflanze die mitochondrialen Genome vor allem als

lineare subgenomische DNA-Moleküle verschiedener Länge vorliegen [Backert et al., 1997; Bendich, 1993], impliziert das *in vitro*-Verhalten von RpoTm die Partizipation eines oder mehrerer unterstützender Proteinfaktoren an der Modulation der DNA-Struktur und/oder Aufschmelzung der DNA-Matrize in *in vitro*-Transkriptionen mit mitochondrialen Extrakten oder *in vivo*.

Das Fehlen eines solchen Faktors wird in den hier durchgeführten *in vitro*-Transkriptionen vermutlich durch das Angebot superhelikaler Matrizen kompensiert, was die Aufschmelzung der Doppelhelix an vielen untersuchten Promotoren erleichtert. Weitere Studien zur Abhängigkeit der Transkriptionseffizienz von RpoTm und RpoTp von der DNA-Konformation (Kap. 3.1.6) belegen zudem, dass eine zirkulär-entspannte Konformation der DNA-Matrize nicht hinreichend für die Initiation der spezifischen Transkription ist, sondern die Matrizen tatsächlich in superhelikaler Form vorliegen müssen (Abbildung 25). Von bakteriellen Promotoren ist bekannt, dass die Formation des offenen Promotorkomplexes vom Ausmaß der Superhelikalität der DNA-Matrize abhängig ist [Übersicht in DeHaseth und Helmann, 1995]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die in superhelikalen Matrizen auftretende hohe Torsionsspannung durch eine Absenkung der für die Promotoraufschmelzung nötigen Energie die spezifische Transkription durch RpoTm und RpoTp *in vitro* ermöglicht.

Versuche an voraufgeschmolzenen DNA-Matrizen erlaubten, ähnlich wie für das Hefeenzym beschrieben, die Transkription durch RpoTm, RpoTmp und RpoTp von linearen Matrizen (Kap. 3.1.7, Abbildung 26). Hierbei erfolgte eine scheinbar spezifische Transkription des bereits auf superhelikalen Matrizen von RpoTm und RpoTp *in vitro* erkannten *Patp8*-228/226-Promotors durch alle drei RpoTs, wogegen der zuvor nicht-erkannte *Patp9*-239-Promotor zu mehrfach Initiationen innerhalb der Transkriptionsblase führte. Diese Ergebnisse lassen im Fall des *Patp8*-Promotors die Partizipation eines oder mehrerer Kofaktoren an der DNA-Aufschmelzung vermuten, wogegen die sequenzspezifische Erkennung der Promotorregion eine intrinsische Fähigkeit der RNA-Polymerasen zu sein scheint (Abbildung 39). Im Fall des *Patp9*-Promotors dagegen könnte *in vivo* zusätzlich zur Aufschmelzung der DNA ein weiterer Faktor die sequenzspezifische Erkennung des Promotors vermitteln.

RpoTp initiierte die Transkription lediglich an drei von elf der untersuchten plastidären NEP-Promotoren auf superhelikalen Matrizen *in vitro* (Tabelle 13), wogegen RpoTmp keinen der angebotenen organellären Promotoren effizient erkannte (vgl. Kap. 4.1.1). Dadurch wird nahe gelegt wird, dass ebenfalls RpoTp und RpoTmp *in vivo* zusätzliche Faktoren für die Ausbildung des offenen Promotorkomplexes und Transkriptionsinitiation benötigen. Auch in

Studien von Liere und Maliga [1999], war das Angebot einer superhelikalen Matrize eine Voraussetzung für die Promotorerkennung durch eine aus Tabak-Plastiden aufgereinigte NEP-Aktivität, was den Verlust assoziierter DNA-aufschmelzender Faktoren während der Enzymisolierung vermuten lässt.

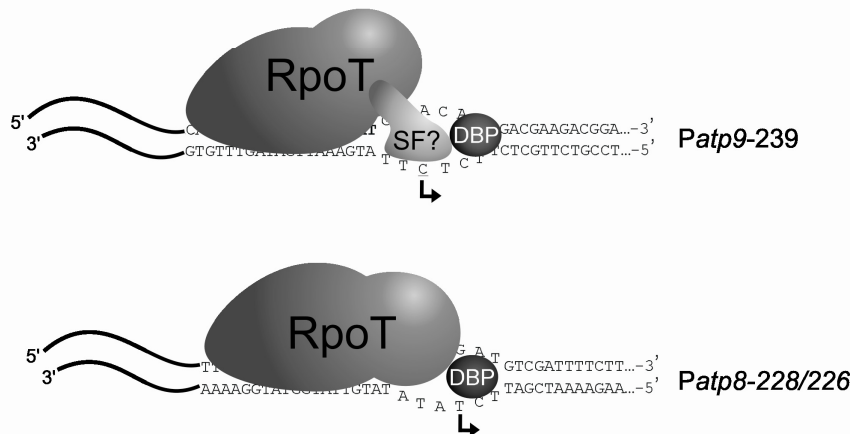


Abbildung 39: Modell zur Transkriptionsinitiation an den mitochondrialen Arabidopsis Promotoren *Patp9-239* und *Patp8-228/226* *in vivo*. Während im Fall von *Patp9* die Promotorspezifität vermutlich durch einen RpoT-Polymerase-assoziierten Spezifitätsfaktor (SF) vermittelt wird, erfolgt die Erkennung des *Patp8*-Promotors durch eine intrinsische Fähigkeit des RpoT-Enzyms selbst. Die Aufschmelzung/Modifikation der DNA scheint in beiden Fällen durch ein hypothetisches DNA-Bindeprotein (DBP) vermittelt zu werden.

Ob es sich bei den organellären Transkriptionsfaktoren pflanzlicher RpoTs um Homologe der im Menschen und der Hefe beschriebenen Proteine mtTFA und mtTFB handelt (vgl. Kap. 1.2.4.2), ist ungeklärt. Es ist bisher nicht gelungen, aus pflanzlichen Organellenextrakten durch biochemische Aufreinigung transkriptionsaktiver Fraktionen Kofaktoren der organellären Transkriptionsapparate zu isolieren.

In Arabidopsis konnten mit Hilfe von *BLAST*-Analysen zwei mögliche Homologe der mtTFB-Faktoren aus Hefe und Mensch als Kandidaten für pflanzliche Kofaktoren der organellären Transkription identifiziert werden [Kühn, 2005, K. Liere, unveröffentlichte Daten]. Für diese RNA-Dimethyltransferase-ähnlichen Proteine, MetA (At5g66360) und MetC (At1g01860), wurde durch GFP-Importstudien eine mitochondriale (MetA) und eine plastidäre (MetC) Lokalisierung präsentiert [Kühn, 2005, B. Kuhla, unveröffentlichte Daten]. Das hier untersuchte Protein MetC wurde zunächst anhand der Arabidopsis-Mutante *pfc-1* als Homolog der kern-

lokalisierten rRNA Dimethylase Dim1 identifiziert [Tokuhisa et al., 1998]. Es handelt sich um eine plastidäre Methyltransferase der kleinen rRNA-Untereinheit, die sich als wichtig für die Chloroplastenentwicklung bei niedrigen Temperaturen erwies. Auch für das MetA-Protein konnte eine Methyltransferaseaktivität gezeigt werden (U. Richter, Humboldt-Universität, Berlin, persönliche Mitteilung). Obwohl für h-mtTFB1/2 sowohl eine Funktion als Dimethyltransferase der 12S rRNA in den Mitochondrien als auch eine Transkriptionsfunktionsfunktion in der mitochondrialen Genexpression nachgewiesen werden konnte [Cotney und Shadel, 2006; McCulloch et al., 2002; Seidel-Rogol et al., 2003], liefern die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Studien keinerlei Hinweis auf eine duale Funktion von MetC (Pfc1) oder MetA in der organellären Gentranskription. Während die Zugabe von sc-mtTFB die *in vitro*-Transkription linearer Matrizen durch das Hefeenzym Rpo41 ermöglichte [Matsunaga und Jaehning, 2004; Winkley et al., 1985], zeigte die Anwesenheit von rekombinantem MetA- bzw. MetC-Protein in *in vitro*-Assays mit RpoTm, RpoTp oder RpoTmp von linearen, superhelikalen [Kap. 3.1.9, Abbildung 28, Kühn, 2005] oder voraufgeschmolzenen (Kap. 3.1.7) Promotormatrizen keinen positiven Einfluss auf deren Transkription.

Parallel zu dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Analysen der mtTFB-Faktoren-ähnlichen rRNA-Methyltransferasen deuten zudem auf eine nähere Verwandtschaft von MetA zu den im Cytoplasma lokalisierten eukaryotischen Dim1-Proteinen als zu den im Phylogramm gut separierten Gruppen mitochondrialer Transkriptionsfaktoren aus der Hefe und tierischen Organismen α -proteobakterieller Herkunft hin [Kühn, 2005; Park et al., 2009]. Auch das MetC/Pfc1-Protein tritt in einer von den mtTFB-Faktoren unabhängigen phylogenetischen Gruppe plastidär lokalisierter RNA-Methyltransferasen auf, die deutliche Ähnlichkeit zu homologen Proteinen aus Chlamydien aufweisen [Park et al., 2009]. Während mtTFB-Homologe durch einen Gentransfer vom endosymbiontischen Vorfahren erworben wurden, scheint im Fall von MetC ein lateraler Gentransfer zwischen einem Chlamydien-ähnlichen Vorfahren und den eukaryotischen Vorfahren stattgefunden zu haben. Diese Analysen werden durch kürzlich publizierte Daten nach denen Methyltransferasen mit hoher Ähnlichkeit zu den mtTFB-Proteinen aus Säugern und Pilzen innerhalb der *Eucarya* lediglich in einigen amoebischen Protisten und Trypanosomen nachweisbar sind, unterstützt [Shutt und Gray, 2006]. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei pflanzlichen Kofaktoren der RpoTs mtTFB-Homologe handelt, da entsprechende Kandidaten aufgrund einer zu großen Aminosäuresequenzvariabilität möglicherweise nicht *in silico* identifiziert wurden oder zusätzliche Kofaktoren für einen funktionalen RNAP-Komplex benötigt werden, scheint eine Beteiligung von MetA bzw. MetC an der organellären Genexpression aufgrund ihrer phyloge-

netischen Herkunft und den hier durchgeführten Analysen unwahrscheinlich. Um eine Transkriptionsfaktorfunktion von MetA und MetC gänzlich auszuschließen, sollte, z. B. durch *Run On*- oder *primer extension*-Analysen, eine detaillierte *in vivo*-Studie der plastidären bzw. mitochondrialen Promotornutzung in der von Tokuhiya et al. [1998] untersuchten *pcf1*-Mutante bzw. einer MetA-Mutante vorgenommen werden.

4.2.3 Regulation der NEP-Aktivität

Während der Entwicklung der Chloroplasten aus Proplastiden kann ein Anstieg der PEP-Aktivität beobachtet werden, der für die Transkription von Genen, deren Produkte für die Ausbildung des Photosyntheseapparates notwendig sind als essentiell erachtet wird. Gleichzeitig scheint die Wichtigkeit der Transkription durch die NEP abzunehmen, da die meisten Haushaltsgene ebenfalls von der PEP transkribiert werden können. In diesem Zusammenhang berichteten Hanaoka et al. [2005] von der erstaunlichen Beobachtung einer spezifisch durch tRNA^{Glu} vermittelten Inhibition rekombinanter RpoTp in *in vitro*-Transkriptionsstudien (vgl. Kap. 1.2.5). Andere untersuchte tRNAs, wie tRNA^{Val}, tRNA^{Trp} und tRNA^{Gly}, zeigten keinerlei Bindung an das rekombinante Enzym RpoTp und führten nicht zu dessen Hemmung [Hanaoka et al., 2005]. Die plastidäre tRNA^{Glu} weist neben ihrer Funktion in der Translation eine besondere Rolle in der Tetrapyrrolbiosynthese auf [Schön et al., 1986]. Hanaoka et al. [2005] schreiben der tRNA^{Glu} eine dritte Funktion als Regulator der RpoTp-Aktivität zu. Ansteigende Mengen dieser von der PEP transkribierten tRNA sollen demnach durch die Runterregulation der NEP-Aktivität während der Chloroplastenentwicklung einen „switch“ zur PEP-Aktivität vermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die inhibitorische Wirkung der tRNA^{Glu} auf das rekombinante Enzym RpoTp im hier genutzten *in vitro*-Transkriptionssystem erneut untersucht (Kap. 3.1.11.2, Abbildung 31). Zusätzlich wurden tRNA-Bindungsstudien mit RpoTp, RpoTnp und der mitochondrialen Polymerase RpoTm durchgeführt (Abbildung 32). Obwohl die hier erlangten Daten eine regulatorische Rolle der tRNA^{Glu} für die Aktivität von RpoTp nicht gänzlich ausschließen, erscheint eine spezifische Hemmung eher unwahrscheinlich: Zwar konnte eine Inhibition der spezifischen und unspezifischen Transkription von RpoTp durch Zugabe von tRNA^{Glu} im *in vitro*-Transkriptionsassay detektiert werden, jedoch trat ein deutlich hemmender Effekt erst bei einem sehr hohen molaren Verhältnis von tRNA zu Protein auf (Abbildung 31 B). Eine ähnlich starke Inhibition des Enzyms konnte ebenfalls bei Zugabe der von Hanaoka et al. als nicht-hemmend beschriebenen tRNAs für Glycin und Valin gezeigt werden (Abbildung 31 B). In den hier durchgeführten Gelmobilitätsstudien wurde zudem eine

Bindung von tRNA^{Glu} an RpoTp, aber auch der zusätzlich untersuchten tRNAs für Gly und Val beobachtet (Abbildung 32). Die Bindung der tRNAs war nicht spezifisch für RpoTp sondern trat auch im Fall von RpoTmp und RpoTm auf (Abbildung 32 B).

In gewisser Übereinstimmung mit Hanaoka et al. [2005] konnte eine Bindung von tRNA an eine Phagentyp-RNA-Polymerase sowie eine Inhibition der transkriptionellen Aktivität nach Zugabe von tRNA beobachtet werden. Für die T7-RNA-Polymerase wurde die Fähigkeit zur RNA-Bindung und eine RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität beschrieben [Arnaud-Barbe et al., 1998; Biebricher und Luce, 1996; Konarska und Sharp, 1989; Konarska und Sharp, 1990]. Auch für die in dieser Arbeit untersuchten rekombinanten Phagentyp RNAPs aus Arabidopsis konnte eine solche RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität gezeigt werden (Kap. 3.1.12), wodurch die Möglichkeit einer generellen Fähigkeit der RpoTs zur RNA-Bindung suggeriert wird. Tatsächlich machten Hanaoka et al. ebenfalls die Beobachtung, dass hohe Mengen variabler tRNAs in *in vitro* Transkriptionsversuchen und Gelmobilitätsassays ähnlich wie tRNA^{Glu} die Transkription inhibierten und die RpoTp-tRNA-Interaktion kompetitierten, wobei tRNA^{Glu} bei den in der Veröffentlichung beschriebenen Konzentrationen spezifischer zu sein schien (M. Hanaoka, persönliche Mitteilung an T. Börner). Hanaoka spekuliert daher über die Fähigkeit zur Bindung und Regulation von RpoTp durch mehrere, wenn nicht alle plastidären tRNAs (M. Hanaoka, persönliche Mitteilung). Es bleibt zu untersuchen, ob die gesehene Interaktion zwischen tRNAs und Phagentyp-RNAPs ebenfalls *in organello* auftritt und hier die Aktivität der Enzyme beeinflusst. Falls dies der Fall ist, spiegelt die hier beobachtete Bindung variabler tRNAs an die RpoT-Enzyme möglicherweise einen transienten Mechanismus zur Runterregulation der Transkriptase-Aktivität bei inhibierter Translation wider, wodurch die Transkriptionsrate kurzfristig der Translationsrate angepasst werden könnte (Abbildung 40).

Für eine regulatorische Aktivität der tRNA^{Glu} spricht die Beobachtung, dass in weißen Blättern der Gerstenmutante *albostrians*, die eine deutlich verminderte Expression dieser tRNA zeigen, eine drastisch erhöhte Aktivität der NEP im Vergleich zu grünen Blättern detektiert wurde [Hess et al., 1993; Hess et al., 1992]. Ob dieser Effekt allerdings auf einer weniger abundanten tRNA^{Glu} beruht oder auf übergeordneten Regulationsmechanismen, die durch eine erhöhte NEP-Aktivität das PEP-Defizit kompensieren, lässt sich aus den Daten nicht ableiten. Interessant wäre beispielsweise die Analyse der NEP-Aktivität tRNA^{Glu}-überexprimierender transplastomer Pflanzen. Es liegen zudem keine Hinweise für eine Runterregulierung der NEP-Aktivität während der Chloroplastenentwicklung und Blattreife vor. Im Gegenteil,

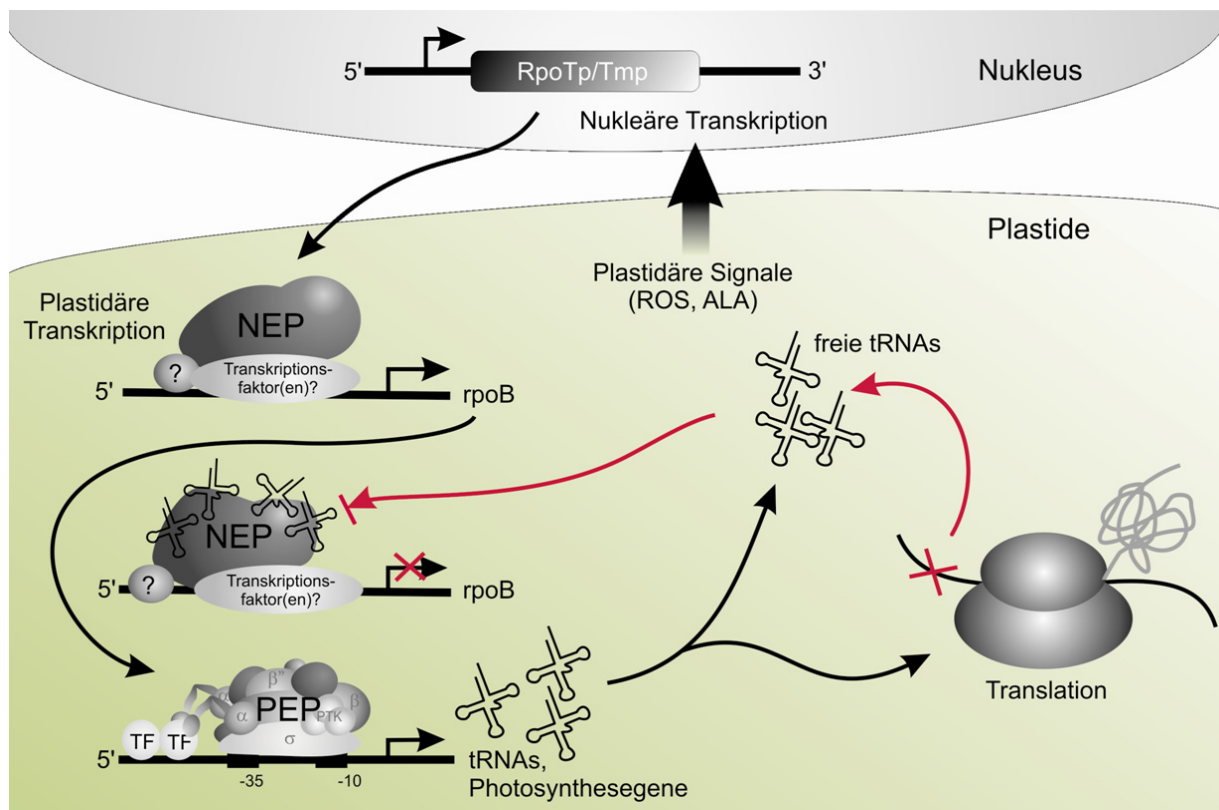


Abbildung 40: Die Rolle der nukleärkodierten Phagentyp-RNA-Polymerasen (NEP) in der Regulation der plastidären Genexpression. Die transkriptionelle NEP-Aktivität wird durch die Produkte der kernlokalisierten *RpoTp*- und *RpoTmp*-Gene repräsentiert. Die NEP transkribiert und reguliert somit möglicherweise die Expression des *rpoB*-Operons, welches für Untereinheiten der plastidärkodierten RNA-Polymerase (PEP) kodiert. Die PEP transkribiert neben Photosynthesegenen diverse tRNA-Gene, deren Produkte für die Translation der plastidären mRNA benötigt werden. Kommt es zu einer Inhibition der Translation (z. B. durch fehlende Aminosäuren) könnten sich unbeladene tRNAs im Stroma anreichern, die wiederum zunächst durch Anlagerung an die NEP deren Konformation verändern und somit Aktivität herabsetzen und letztlich ebenfalls zur Runterregulation der PEP-Expression führen könnten. Der Einfluss diverser plastidärer Signale, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und δ -Aminolävulinat (ALA), die die Kerntranskription beeinflussen, sind angedeutet.

eine substantielle NEP-Aktivität scheint in allen Chloroplastenentwicklungsstadien und Plastidentypen aufzutreten. Einige essentielle Gene werden ausschließlich von NEP-Promotoren transkribiert. Die Transkription des in allen Plastidentypen (einschließlich reifer Chloroplasten) exprimierten *clpP*-Gens der Monokotyledonen beispielsweise erfolgt ausschließlich von einem Typ I-NEP- Promotor [Silhavy und Maliga, 1998; Silhavy und Maliga, 1998]. Demgegenüber steht die geringe Expression des *PrpoB*-TypI-NEP-Promotors in reifen Chloroplasten [Baumgartner et al., 1993; Rapp et al., 1992], wodurch eine Regulation der Expression von TypI-NEP-Promotoren in späteren Entwicklungsstadien durch sequenzspezifische Regulationsfaktoren und weniger durch eine generelle Regulation der NEP-Aktivität suggeriert wird. Cahoon et al. [2004] beobachten in Mais sogar einen Anstieg der NEP (RpoTp)-Aktivität während der Blattreife. Hinzu kommt die in Arabidopsis beobachtete Aktivität

NEP-abhängiger Promotoren während der gesamten Blattentwicklung bis zum Beginn der Seneszenz [Zoschke et al., 2007]. Da es in dikotylen Pflanzen wie *Arabidopsis* zwei NEP-Enzyme (RpoTp und RpoTmp) gibt, ist dennoch, wie von Hanaoka angenommen, eine Hemmung von RpoTp durch tRNA^{Glu} denkbar, da RpoTmp die Transkription NEP-abhängiger Gene in späteren Blattentwicklungsstadien durchführen könnte. Tatsächlich konnte in *Arabidopsis*-Insertionslinien gezeigt werden, dass RpoTp und RpoTmp einander größtenteils ersetzen können [Courtois et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008].

In *Arabidopsis* sind die *RpoTp*-Promotoraktivität sowie Transkriptmenge in grünem Gewebe verglichen mit nicht-grünem erhöht, wogegen der *RpoTmp*-Promotor die höchste Aktivität in jungen Zellen und nicht-grünen Geweben aufweist [Emanuel et al., 2006]. Die niedrigsten, aber detektierbaren RpoTmp-Transkriptmengen finden sich in reifem Blattgewebe. Die Beobachtungen von Emanuel et al. [2006] sind in Übereinstimmung mit einer Aktivität unterschiedlicher NEP-Promotoren in reifen Blättern [Zoschke et al., 2007]. Diese Studien suggerieren eine Regulation der NEP (RpoTp und RpoTmp) auf Ebene der RpoT-Genexpression.

Die geringe Anzahl *in vitro* erkannter plastidärer NEP-Promotoren (Kap. 3.1.3) unterstützt die Annahme einer Regulation der NEP-abhängigen Promotornutzung durch eine zell-, gewebe- oder entwicklungsabhängige differentielle Expression kernkodierter Spezifitätsfaktoren. Inwieweit und auf welchem Wege eine Regulation der Aktivität von RpoTp und RpoTmp selbst erfolgt (z. B. durch die Bindung von tRNAs), bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3 Ähnlichkeiten der Genexpressionssysteme in Chloroplasten und Mitochondrien

Die Transkriptionsapparate der Mitochondrien und Plastiden weisen deutliche Ähnlichkeiten auf. Alle mitochondrialen und ein Teil der plastidären Gene werden von verwandten kernkodierten Phagentyp-RNA-Polymerasen transkribiert. Die Homologie organellärer Phagentyp-RNAPs sowie das Auftreten ein und derselben RpoT-RNA-Polymerase in den Mitochondrien und Plastiden dikotyler Pflanzen wirft zudem die Möglichkeit ähnlicher Transkriptions- und Regulationsfaktoren in beiden Kompartimenten auf. Darüber hinaus zeigen viele mitochondriale und einige plastidäre NEP-Promotoren besonders durch das Auftreten einer YRTA-Promotorkernsequenz stromaufwärts des Transkriptionsinitiationsortes eine ähnliche strukturelle Organisation (vgl. Kap. 1.2.3).

Um die Ähnlichkeit organellärer Promotoren aus *Arabidopsis* genauer zu charakterisieren, wurde eine Distanzanalyse bekannter mitochondrialer und plastidärer RpoT-abhängiger Promotorsequenzen durchgeführt. Die auffälligste Gemeinsamkeit der meisten dieser

organellären Promotoren ist das Auftreten eines TA-Motivs innerhalb der Promotorkernsequenz (vgl. Tabelle 13 und Anhang 1). Da zudem im Rahmen dieser Arbeit die Wichtigkeit dieser Nukleotide für die intrinsische Erkennung durch RpoTm und RpoTp gezeigt werden konnte (vgl. Kap. 4.1.2), wurden Promotoren mit Nicht-Konsensustyp Sequenzen, wie der NEP Typ II Promotor *PclpP*-58 oder *Pc Prrn16*-139 sowie Promotoren, denen keine Kernsequenz zugewiesen werden konnte (z. B. *PtrnM*-574/573, *PaccD*-172) von der Analyse ausgeschlossen.

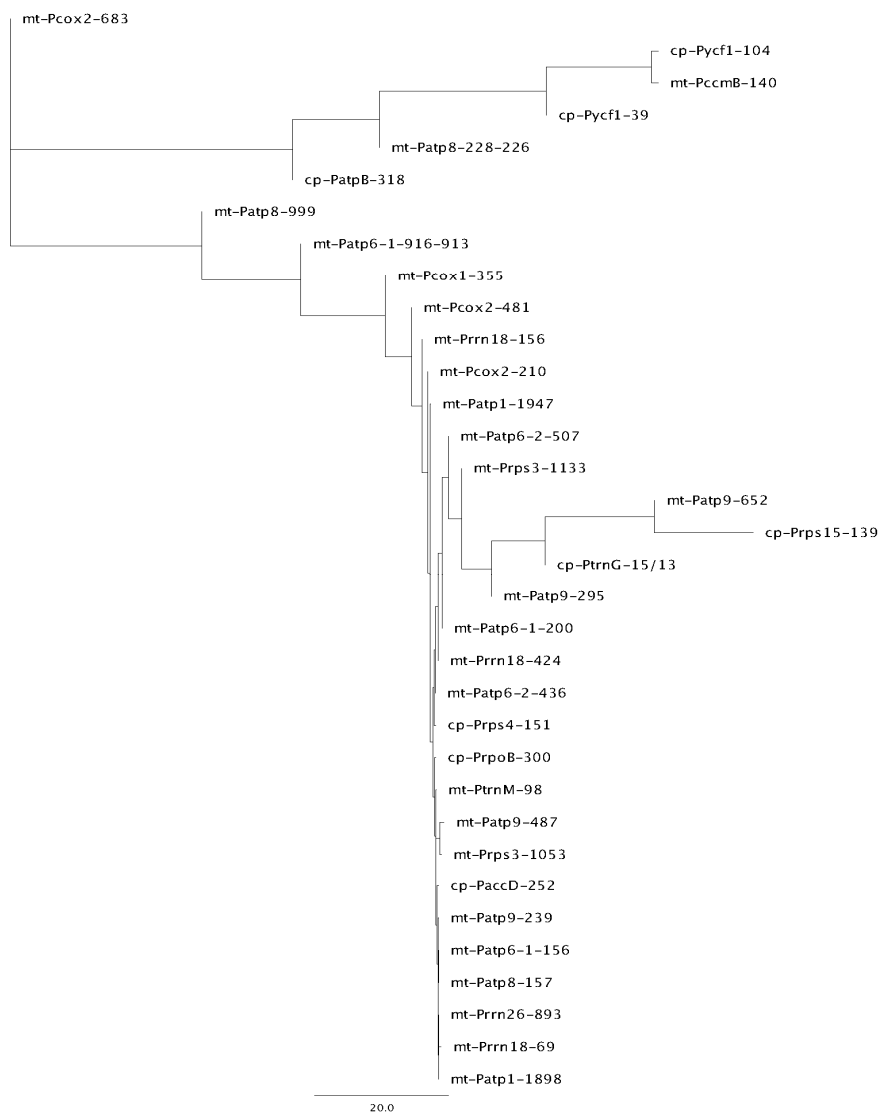


Abbildung 41: Distanzanalyse mitochondrialer (mt) und plastidärer (cp) RpoT-abhängiger Promotoren aus *Arabidopsis thaliana*. Zur Rekonstruktion des Baums wurde die “Neighbor-joining”-Methode verwendet [Saitou und Nei, 1987]. Mutationsraten wurden mit dem “Jukes-Cantor” Substitutionsmodell [Jukes und Cantor, 1969] korrigiert. Die Promotoren sind entsprechend ihrer organellären Herkunft gekennzeichnet. Die korrespondierenden Sequenzen sowie das zugrunde liegende Alignment sind dem Anhang 1 zu entnehmen.

Die Ergebnisse der in Abbildung 41 dargestellten Distanzanalyse zeigen, dass wie vermutet, weder die plastidären noch die mitochondrialen Sequenzen individuelle, Organellenspezifische Gruppen ausbilden. Im Gegenteil, viele plastidäre Promotoren scheinen in ihrer Sequenz mitochondrialen Promotoren ähnlicher zu sein als anderen plastidären Promotoren und umgekehrt.

Trotz der konservierten Elemente innerhalb der organellären Promotoren weisen die Sequenzen eine große Vielfältigkeit auf, die oftmals keine eindeutige Zuordnung Plastiden- oder Mitochondrien-spezifischer Charakteristika erlaubt. Die Analyse weist nicht auf eine signifikante Adaptation der entsprechenden RNAP an ihre nativen Promotoren hin, sondern spricht eher für eine sehr relaxierte, in den Plastiden möglicherweise Kofaktor-vermittelte Promotorspezifität. Dies wird ebenfalls durch die hier durchgeführten *in vitro*-Transkriptionen unterstützt, in denen das plastidäre Enzym RpoTp und das mitochondriale RpoTm eine überlappende Gruppe organellärer Promotoren annähernd gleich effizient transkribierten (vgl. Kap. 4.1.1 und 4.1.2).

Aufgrund dieser vielfältigen Ähnlichkeiten der organellären Genexpressionssysteme wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit das plastidäre Transkriptionssystem *in planta* in der Lage ist, an einem mitochondrialen Promotor korrekt zu initiieren [Kap. 3.2, Bohne et al., 2007]. Für die genetische Manipulation des Plastoms wurde die gut zu transformierende dikotyle Pflanze *Nicotiana tabacum* ausgewählt. *N. tabacum*, eine allotetraploide Pflanze, besitzt sechs aktive Gene für organelläre Phagentyp-RNA-Polymerasen, von denen jeweils zwei für RpoTm, RpoTmp und RpoTp kodieren [Hedtke et al., 2002]. Die Tabak-Chloroplasten wurden mit einem Konstrukt transformiert, welches eine Kanamycin-Resistenzkassette (*nptII*) unter Kontrolle des mitochondrialen Promotors *PatpA*-209 aus *Oenothera berteriana* [Binder und Brennicke, 1993] beinhaltet. Die durchgeführten Analysen erbrachten den Nachweis der korrekten Transkriptionsinitiation am mitochondrialen *PatpA*-Promotor durch eine plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase *in vitro* und *in vivo* (Kap. 3.2.1, 3.2.2). Während das dual-lokalisierte Arabidopsis Enzym RpoTmp *in vitro* nicht in der Lage war am *PatpA*-Promotor zu initiieren, zeigten AtRpoTm und AtRpoTp eine deutliche Präferenz zur Initiation an *PatpA*-209 gegenüber zufälligen Initiationsorten (Abbildung 35). Durch Kartierung des *nptII*-Transkript-5'-Endes konnte die korrekte Erkennung des *PatpA*-Promotors durch die plastidäre Transkriptionsmaschinerie *in vivo* demonstriert werden (Abbildung 37). Interessanterweise zeigten *Run On*-Analysen mit isolierten Chloroplasten, dass das chimäre *nptII*-Gen in isolierten Plastiden sogar effizienter transkribiert wurde als vergleichend analysierte NEP-abhängige Gene (Abbildung 38). Welche RNA-Polymerase für

die Transkription des *PatpA*-Promotors in den Plastiden der transplastomen Pflanzen *in vivo* verantwortlich ist, lässt sich aus den Daten nicht zweifelsfrei ableiten. Es ist jedoch aufgrund der *in vitro*-Transkriptionsergebnisse wahrscheinlicher, dass RpoTp und nicht RpoTm diesen mitochondrialen Promotor in den Plastiden transkribiert.

Die Beobachtungen werfen interessante evolutionäre Betrachtungen auf. RpoTm und RpoTp haben die intrinsische Fähigkeit zur Promotorerkennung während der Evolution beibehalten, wogegen RpoTm diese Fähigkeit scheinbar verloren hat. Das plastidäre Enzym RpoTp war allerdings *in vitro* weniger effizient in der Initiation an *PatpA*-209 als das mitochondriale Enzym RpoTm, wodurch eine evolutionäre Adaptation von RpoTp an plastidäre Promotoren oder Kofaktoren suggeriert wird. Detaillierte Analysen der RNAP-Promotor-Interaktionen sind nötig um diese Fragestellung zu erläutern.

Des Weiteren deutet die präzise Erkennung des mitochondrialen Promotors durch den plastidären Transkriptionsapparat trotz einer wahrscheinlich früh in der Entwicklung der Angiospermen aufgetretenen Separation der plastidären und mitochondrialen Phagentyp-Polymerasen [Liere und Börner, 2007] auf einen erstaunlich konservierten Mechanismus der Promotorerkennung in beiden Organellen hin. Hinzu kommt die akkurate Initiation an *PatpA*-209 in transgenen Chloroplasten, wogegen RpoTp *in vitro* weniger präzise initiierte. Diese Beobachtungen lassen die Partizipation eines oder mehrerer plastidärer Transkriptionsfaktoren an der *PatpA*-Promotorerkennung *in vivo* vermuten, was darauf hindeuten könnte, dass nicht ausschließlich die RNA-Polymerasen und Promotoren sondern ebenfalls assoziierte Komponenten evolutionär mit den korrespondierenden Faktoren in den Mitochondrien verwandt sind. Eine denkbare Erklärung für eine solch starke Konservierung könnte die Abhängigkeit des evolutionären Spielraums von den Anforderungen einer Koevolution von Promotoren, RNA-Polymerasen und ihrer mutmaßlichen Transkriptionsfaktoren sein.

Ein weiterer Aspekt ist, dass die Erkennung eines mitochondrialen Promotors durch eine plastidäre RNA-Polymerase *in vivo* und möglicherweise ebenfalls die Erkennung eines plastidären Promotors durch das mitochondriale Enzym Gentransferereignisse zwischen den Organellen erleichtern könnte. Es ist bekannt, dass ein Teil der mitochondrialen tRNA-Gene plastidärer Herkunft sind und durch den Gentransfer vom Plastom in das Chondrom erworben wurden [Bock, 2006; Veronico et al., 1996]. Interessanterweise wurde der in dieser Arbeit untersuchte plastidäre, nicht-konservierte *trnG*-15/13 Promotor *in vitro* durch die mitochondriale RNAP RpoTm erkannt (vgl. Kap. 4.1.2, Abbildung 15 und 16). Es ist vorstellbar, dass das unmittelbare Funktionieren plastidärer tRNA-Gene im Mitochondrium eine schnelle

Substitution der entsprechenden mitochondrialen Gene ermöglichte, wodurch eine mutationsbedingte Veränderung der nicht-funktionalen promiskuitiven DNA verhindert würde.

Die von Dr. S. Ruf (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm) durchgeführten Untersuchungen der transplastomen Tabakpflanzen belegen eine geringe Expression enzymatisch aktiven NptII-Proteins [Bohne et al., 2007, Abbildungen 3 und 5]. Demnach ist die plastidäre Translationsmaschinerie fähig die Proteinbiosynthese an einem mitochondrialen 5'-UTR zu initiieren. Über die Translationssignale pflanzlicher Mitochondrien ist bislang wenig bekannt. Einige konservierte Sequenzelemente konnten stromaufwärts des Translationsinitiationskodons identifiziert werden, die möglicherweise in die Rekrutierung der Ribosomen zum 5'-UTR involviert sind [Hazle und Bonen, 2007; Pring et al., 1992]. Pflanzliche mitochondriale 5'-UTRs weisen in der Regel keine Shine-Dalgarno-ähnlichen Sequenzmotive auf, die über komplementäre Basenpaarung mit dem 3'-Ende der 16S rRNA als Ribosomenbindungsstelle fungieren könnten. Im Gegensatz dazu besitzen viele plastidäre mRNAs eine solche Shine-Dalgarno-Sequenz, die für die Translationsinitiation benötigt wird [Hirose und Sugiura, 2004; Zerges, 2000]. Dennoch kommen plastidäre Transkripte vor, in denen keine offensichtliche Shine-Dalgarno-Sequenz vorliegt [Fargo et al., 1998; Hirose und Sugiura, 2004]. Es wird allgemein angenommen, dass mRNA-spezifische Translationsaktivatoren *cis*-Elemente im 5'-UTR dieser RNAs erkennen und die Ribosomen rekrutieren [Gillham et al., 1994; Schwarz et al., 2007; Stern et al., 1997; Zerges, 2000].

In Anbetracht dieser deutlichen Unterschiede in den Translationsmechanismen zwischen den Chloroplasten und Mitochondrien ist es erstaunlich, dass das 5'-UTR des mitochondrialen *atpA*-Gens die Translation in den transgenen Plastiden vermitteln kann. Da aufgrund der geringen Konservierung der 5'-UTRs pflanzlicher mitochondrialer Transkripte bislang keine eindeutigen Translationssignale zugeordnet werden konnten, bleibt die molekulare Grundlage der korrekten Positionierung der Ribosomen jedoch unklar.

Durch das Funktionieren mitochondrialer Expressionssignale, d. h. mitochondriale 5'- und 3'-UTRs, in den Plastiden werden neue Möglichkeiten der plastidären Genmanipulation eröffnet. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass der integrierte *PatpA*-Promotor stärker transkribiert wurde als die endogenen NEP-abhängigen Promotoren *PrpoB* und *PclpP* (Abbildung 38). Bislang wurden für die Expression von Fremdgenen in den Plastiden in der Regel plastidäre Expressionssignale verwendet. Ein Nachteil der Nutzung plastidärer Promotoren und 3'-UTRs liegt in der Duplikation endogener Sequenzen, was zu unerwünschten homologen Rekombinationen und somit möglicherweise zu Deletionen oder Inversionen innerhalb des Plastoms führen kann [Iamtham und Day, 2000; Rogalski et al.,

2006; Svab und Maliga, 1993]. Durch die alternative Integration mitochondrialer Expressionssignale könnte das Risiko einer durch Rekombination induzierten Genominstabilität deutlich reduziert werden. Aufgrund der im Vergleich zur PEP-abhängigen Fremdgenexpression [De Cosa et al., 2001; Herz et al., 2005; Tregoning et al., 2003; Watson et al., 2004] niedrigeren NEP-abhängigen Expression eignen sich mitochondriale Expressionssignale für Anwendungen bei denen moderate oder niedrige Expressionsniveaus erwünscht sind. Alternativ könnte das mitochondriale Expressionssignal dahingehend verändert werden, dass in das 5'-UTR eine Shine-Dalgarno-Sequenz integriert wird, die vermutlich eine höhere Translationseffizienz erlauben würde.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdallah, F; Salamini, F und Leister, D (2000): A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis, Trends in Plant Science 5 [4], Seite 141-142.
- Adams, K. L.; Daley, D. O.; Qiu, Y. L.; Whelan, J. und Palmer, J. D. (2000): Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants, Nature 408 [6810], Seite 354-357. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11099041
- Adams, K. L.; Qiu, Y. L.; Stoutemyer, M. und Palmer, J. D. (2002): Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution, Proc Natl Acad Sci U S A 99 [15], Seite 9905-9912. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12119382
- Adams, K. L.; Song, K.; Roessler, P. G.; Nugent, J. M.; Doyle, J. L.; Doyle, J. J. und Palmer, J. D. (1999): Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes, Proc Natl Acad Sci U S A 96 [24], Seite 13863-13868. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10570164
- Alam, T. I.; Kanki, T.; Muta, T.; Ukaji, K.; Abe, Y.; Nakayama, H.; Takio, K.; Hamasaki, N. und Kang, D. (2003): Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM, Nucleic Acids Res 31 [6], Seite 1640-1645. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12626705
- Allison, L. A. (2000): The role of sigma factors in plastid transcription, Biochimie 82 [6-7], Seite 537-48. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20405535>
- Allison, L. A. und Maliga, P. (1995): Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter, EMBO Journal 14 [15], Seite 3721-3730. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394447>
- Allison, L. A.; Simon, L. D. und Maliga, P. (1996): Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants, EMBO Journal 15 [11], Seite 2802-2809. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=450217&blobtype=pdf>
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. und Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Research 25 [17], Seite 3389-3402. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/25/17/3389>
- Altschul, Stephen F.; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene W. und Lipman, David J. (1990): Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology 215 [3], Seite 403-410. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-4N0J174-8/2/37c69feb1cd9b63368705c2f5f099c5b>
- Amiott, Elizabeth A. und Jaehning, Judith A. (2006): Mitochondrial Transcription Is Regulated via an ATP "Sensing" Mechanism that Couples RNA Abundance to Respiration, Molecular Cell 22 [3], Seite 329-338. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSR-4JW6SXB-4/2/c43a326b55f330ac977fba1f9ab7b5bb>
- Amiott, Elizabeth A. und Jaehning, Judith A. (2006): Sensitivity of the Yeast Mitochondrial RNA Polymerase to +1 and +2 Initiating Nucleotides, Journal of Biological Chemistry 281 [46], Seite 34982-34988. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/281/46/34982>
- Andre, C.; Levy, A. und Walbot, V. (1992): Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes, Trends Genet 8 [4], Seite 128-132. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1631955

- Antoshechkin, I. und Bogenhagen, D. F. (1995): Distinct roles for two purified factors in transcription of *Xenopus* mitochondrial DNA, *Molecular & Cellular Biology* 15 [12], Seite 7032-7042. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/reprint/15/12/7032?view=long&pmid=8524270>
- Argaman, L.; Hershberg, R.; Vogel, J.; Bejerano, G.; Wagner, E.G.; Margalit, H. und Altuvia, S. (2001): Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*, *Current Biology* 11 [12], Seite 941-950. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448770>
- Arnaud-Barbe, N.; Cheynet-Sauvion, V.; Oriol, G.; Mandrand, B. und Mallet, F. (1998): Transcription of RNA templates by T7 RNA polymerase, *Nucleic Acids Research* 26 [15], Seite 3550-3554. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147742>
- Azevedo, Jacinthe; Courtois, Florence und Lerbs-Mache, Silva (2006): Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts, *Nucleic Acids Research* 34 [2], Seite 436-444. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/34/2/436>
- Baba, Kyoko; Schmidt, Julien; Espinosa-Ruiz, Ana; Villarejo, Arsenio; Shiina, Takashi; Gardestrom, Per; Sane, Aniruddha P. und Bhalarao, Rishikesh P. (2004): Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the *RpoT*;2 mutant of *Arabidopsis*, *Plant Journal* 38 [1], Seite 38-48. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.1365-3113X.2004.02022.x/abs>
- Backert, S.; Lurz, R.; Oyarzabal, O. A. und Börner, T. (1997): High content, size and distribution of single-stranded DNA in the mitochondria of *Chenopodium album* (L.), *Plant Mol Biol* 33 [6], Seite 1037-1050. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9154985
- Backert, S.; Nielsen, B. L. und Börner, T. (1997): The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants, *Trends in Plant Science* 2 [12], Seite 477-483. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD1-3RV5SM8-5&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=cb7c592e5a3ff60c0b1073103f513317
- Baena-Gonzalez, Elena; Baginsky, Sacha; Mulo, Paula; Summer, Holger; Aro, Eva-Mari und Link, Gerhard (2001): Chloroplast Transcription at Different Light Intensities. Glutathione-Mediated Phosphorylation of the Major RNA Polymerase Involved in Redox-Regulated Organellar Gene Expression, *Plant Physiology* 127 [3], Seite 1044-1052. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/127/3/1044>
- Baeza, L.; Bertrand, A.; Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1991): Characterization of a protein binding sequence in the promoter region of the 16S rRNA gene of the spinach chloroplast genome, *Nucleic Acids Research* 19 [13], Seite 3577-3581. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=328382>
- Baginsky, S.; Tiller, K. und Link, G. (1997): Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*), *Plant Molecular Biology* 34 [2], Seite 181-189. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97351552>
- Baginsky, S.; Tiller, K.; Pfanschmidt, T. und Link, G. (1999): PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid *in vitro* transcription., *Plant Molecular Biology* 39, Seite 1013-1023. URL: <http://www.springerlink.com/content/p42860010711386q/>
- Bannai, H.; Tamada, Y.; Maruyama, O.; Nakai, K. und Miyano, S. (2002): Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals, *Bioinformatics* 18 [2], Seite 298-305. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11847077
- Barkan, A. (1988): Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs, *EMBO Journal* 7 [9], Seite 2637-2644. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=457051>
- Barkan, A. und Goldschmidt-Clermont, M. (2000): Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression, *Biochimie* 82 [6-7], Seite 559-72. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20405537>

- Barkan, Alice (2004): Intron splicing in plant organelles, Daniell, Henry und Chase, Christine D., Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles Seite 295-322, Springer, Dordrecht. URL: <http://www.springerlink.com/content/u616k146n7114511/>
- Barnes, W. M. und Tuley, E. (1983): DNA sequence changes of mutations in the histidine operon control region that decrease attenuation, Journal of Molecular Biology 165 [3], Seite 443-59. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6302291>
- Baumgartner, B. J.; Rapp, J. C. und Mullet, J. E. (1993): Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development: evidence for selective stabilization of *psbA* mRNA, Plant Physiology 101 [3], Seite 781-791. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=158691>
- Beardslee, Thomas A.; Roy-Chowdhury, Sanchita; Jaiswal, Pankaj; Buhot, Laurence; Lerbs-Mache, Silva; Stern, David B. und Allison, Lori A. (2002): A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts, Plant Journal 31 [2], Seite 199-209. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3113X.2002.01344.x>
- Bendich, A. J. (1993): Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure, Current Genetics 24 [4], Seite 279-290. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8252636
- Bendich, A. J. (2004): Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion, Plant Cell 16 [7], Seite 1661-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15235123
- Bensing, B. A.; Meyer, B. J. und Dunny, G. M. (1996): Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93 [15], Seite 7794-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8755555
- Biebricher, C K und Luce, R (1996): Template-free generation of RNA species that replicate with bacteriophage T7 RNA polymerase., EMBO Journal 15 [13], Seite 3458-3465. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=451910>
- Binder, S. und Brennicke, A. (2003): Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358 [1429], Seite 181-188. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12594926
- Binder, S.; Hatzack, F. und Brennicke, A. (1995): A novel pea mitochondrial *in vitro* transcription system recognizes homologous and heterologous mRNA and tRNA promoters, Journal of Biological Chemistry 270 [38], Seite 22182-22189. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=95403406>
- Binder, S.; Marchfelder, A. und Brennicke, A. (1996): Regulation of gene expression in plant mitochondria, Plant Molecular Biology 32 [1-2], Seite 303-314. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=97134924>
- Binder, Stefan und Brennicke, Axel (1993): Transcription initiation sites in mitochondria of *Oenothera berteriana*, Journal of Biological Chemistry 268 [11], Seite 7849-7855. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/268/11/7849>
- Biswas, T. K. (1999): Nucleotide sequences surrounding the nonanucleotide promoter motif influence the activity of yeast mitochondrial promoter, Biochemistry 38 [30], Seite 9693-9703. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10423248
- Biswas, T. K. und Getz, G. S. (1986): A critical base in the yeast mitochondrial nonanucleotide promoter. Abolition of promoter activity by mutation at the -2 position, Journal of Biological Chemistry 261 [9], Seite 3927-3930. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/261/9/3927>
- Bligny, M.; Courtois, F.; Thaminy, S.; Chang, C.C.; Lagrange, T.; Baruah-Wolff, J.; Stern, D. und Lerbs-Mache, S. (2000): Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2

- with two different RNA polymerases, EMBO Journal 19 [8], Seite 1851-60. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20237621>
- Bock, Ralph (2006): Extranuclear inheritance: Gene transfer out of plastids, Progress in Botany 67 Seite 75-100. URL: http://dx.doi.org/10.1007/3-540-27998-9_4
- Bogenhagen, D. F. (1996): Interaction of mtTFB and mtRNA polymerase at core promoters for transcription of *Xenopus laevis* mtDNA, Journal of Biological Chemistry 271 [20], Seite 12036-12041. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/271/20/12036>
- Bohne, Alexandra- V.; Irihimovitch, Vered; Weihe, Andreas und Stern, David (2006): *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a single sigma⁷⁰-like factor which likely functions in chloroplast transcription, Current Genetics 49 [5], Seite 333-340. URL: <http://springerlink.metapress.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s00294-006-0060-7>
- Bohne, Alexandra-Viola; Ruf, Stephanie; Börner, Thomas und Bock, Ralph (2007): Faithful transcription initiation from a mitochondrial promoter in transgenic plastids, Nucleic Acids Research 35 [21], Seite 7256-7266. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/gkm679v1>
- Bonen, L. und Doolittle, W. F. (1975): On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts, Proc. Natl. Acad. Sci. 72 [6], Seite 2310-2314. URL: <http://www.pnas.org/content/72/6/2310.abstract>
- Boore, J. L. (1999): Animal mitochondrial genomes, Nucleic Acids Res 27 [8], Seite 1767-1780. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10101183
- Bown, J.; Barne, K.; Minchin, S. und Busby, S. (1997): Extended -10 promoters, Nucleic Acids Mol. Biol. 11, Seite 41-52.
- Boyer, S. K. und Mullet, J. E. (1988): Sequence and transcript map of barley chloroplast *psbA* gene, Nucleic Acids Research 16 [16], Seite 8184. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=338529>
- Bradley, D. und Gatenby, A.A. (1985): Mutational analysis of the maize chloroplast ATPase-beta subunit gene promoter: the isolation of promoter mutants in *E. coli* and their characterization in a chloroplast *in vitro* transcription system, EMBO Journal 4 [13B], Seite 3641-8. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/86136006>
- Buetow, D E (1976): Phylogenetic origin of the chloroplast, Journal of Protozoology 23 [1], Seite 41-47. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119646297/abstract>
- Bullerwell, C. E. und Gray, M. W. (2004): Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants, Curr Opin Microbiol 7 [5], Seite 528-534. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15451509
- Bülow, S. und Link, G. (1988): Sigma-like activity from mustard (*Sinapis alba* L.) chloroplasts conferring DNA-binding and transcription specificity to *E. coli* core RNA polymerase, Plant Molecular Biology 10 [4], Seite 349-357. URL: <http://www.springerlink.com/content/kp0n8745687g6848/>
- Bünger, W. und Feierabend, J. (1980): Capacity for RNA synthesis in 70S ribosome-deficient plastids of heat-bleached rye leaves, Planta 149 [2], Seite 163-169. URL: <http://www.springerlink.com/content/w4142j44p6060324/>
- Burger, Gertraud; Gray, Michael W. und Franz Lang, B. (2003): Mitochondrial genomes: anything goes, Trends in Genetics 19 [12], Seite 709-716. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCY-49WMWWJ-1/2/08f74b5a2eb3f9fe948058f3167bb56f>
- Cahoon, A. Bruce; Harris, Faith M. und Stern, David B. (2004): Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type, EMBO Reports 5 [8], Seite 801-806. URL: <http://www.nature.com/embor/journal/v5/n8/full/7400202.html>
- Cannon, G. C.; Ward, L. N.; Case, C. I. und Heinhorst, S. (1999): The 68 kDa DNA compacting nucleoid protein from soybean chloroplasts inhibits DNA synthesis *in vitro*, Plant Molecular Biology 39 [4], Seite 835-845. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10350096
- Caoile, A. G. und Stern, D. B. (1997): A conserved core element is functionally important for maize mitochondrial promoter activity *in vitro*, Nucleic Acids Research 25 [20], Seite 4055-4060.

- URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9321657
- Cermakian, N.; Ikeda, T.M.; Miramontes, P.; Lang, B.F.; Gray, M.W. und Cedergren, R. (1997): On the evolution of the single-subunit RNA polymerases, *Journal of Molecular Evolution* 45 [6], Seite 671-681. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98080640>
- Champoux, James J. (2001): DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism, *Annual Review of Biochemistry* 70 [1], Seite 369-413. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
- Chang, C. C.; Sheen, J.; Bligny, M.; Niwa, Y.; Lerbs-Mache, S. und Stern, D. B. (1999): Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases, *Plant Cell* 11 [5], Seite 911-926. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10330475
- Cheetham, Graham M. T. und Steitz, Thomas A. (2000): Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases, *Current Opinion in Structural Biology* 10 [1], Seite 117-123. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VS6-3YS8JMW-M/2/f4bc3a803ef81a57c445284b20818341>
- Cheng, Y. S.; Lin, C. H. und Chen, L. J. (1997): Transcription and processing of the gene for spinach chloroplast threonine tRNA in a homologous *in vitro* system, *Biochem Biophys Res Commun* 233 [2], Seite 380-385. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WBK-45RFDNH-4N&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=b3e5edc0dcc4ecd4a29da1e68f5225
- Christiansen, J. (1988): The 9S RNA precursor of *Escherichia coli* 5S RNA has three structural domains: implications for processing, *Nucleic Acids Res* 16 [15], Seite 7457-7476. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3045757
- Christopher, D. A. ; Li, X. L. ; Kim, M. und Mullet, J. E. (1997): Involvement of protein kinase and extraplasmidic Serine/Threonine protein phosphatases in signaling pathways regulating plastid transcription and the *psbD* blue light-responsive promoter in barley, *Plant Physiology* 113 [4], Seite 1273-1282. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/113/4/1273>
- Chun, L.; Kawakami, A. und Christopher, D. A. (2001): Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves, *Plant Physiology* 125 [4], Seite 1957-1966. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11299375
- Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucleic Acids Res* 16 [22], Seite 10881-10890. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2849754
- Cotney, Justin und Shadel, Gerald, S. (2006): Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2, *Journal of Molecular Evolution* V63 [5], Seite 707-717. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-006-0075-1>
- Courtois, Florence; Merendino, Livia; Demarsy, Emilie; Mache, Regis und Lerbs-Mache, Silva (2007): Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Transcribes the *rrn* Operon from the PC Promoter at Early Developmental Stages in Arabidopsis, *Plant Physiology* 145 [3], Seite 712-721. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/145/3/712>
- Dai, H.; Lo, Y. S.; Litvinchuk, A.; Wang, Y. T.; Jane, W. N.; Hsiao, L. J. und Chiang, K. S. (2005): Structural and functional characterizations of mung bean mitochondrial nucleoids, *Nucleic Acids Res* 33 [15], Seite 4725-4739. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16116038

- Däschner, K.; Couee, I. und Binder, S. (2001): The mitochondrial isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase of Arabidopsis oxidizes intermediates of leucine and valine catabolism, *Plant Physiol* 126 [2], Seite 601-612. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11402190
- Däschner, K.; Thalheim, C.; Guha, C.; Brennicke, A. und Binder, S. (1999): In plants a putative isovaleryl-CoA-dehydrogenase is located in mitochondria, *Plant Mol Biol* 39 [6], Seite 1275-1282. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10380813
- De Cosa, Brandy ; Moar, William; Lee, Seung-Bum; Miller, Michael und Daniell, Henry (2001): Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals, *Nature Biotechnology* 19 [1], Seite 71-74. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/83559>
- DeHaseth, Pieter L. und Helmann, John D. (1995): Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA, *Molecular Microbiology* 16 [5], Seite 817-824. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02309.x>
- Del Campo, Eva M. (2009): Post-Transcriptional Control of Chloroplast Gene Expression *Gene Regulation and Systems Biology* 3, Seite 31-47. URL: <http://www.la-press.com/post-transcriptional-control-of-chloroplast-gene-expression-a1351>
- Deng, X. W. und Gruissem, W. (1987): Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation, *Cell* 49 [3], Seite 379-387.
- DePamphilis, C. W. und Palmer, J. D. (1990): Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant, *Nature* 348 [6299], Seite 337-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250706>
- Diffley, J. F. und Stillman, B. (1991): A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 [17], Seite 7864-7868. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1881919
- Diffley, J. F. und Stillman, B. (1992): DNA binding properties of an HMG1-related protein from yeast mitochondria, *J Biol Chem* 267 [5], Seite 3368-3374. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1737791
- Dombrowski, S.; Hoffmann, M.; Guha, C. und Binder, S. (1999): Continuous primary sequence requirements in the 18-nucleotide promoter of dicot plant mitochondria, *Journal of Biological Chemistry* 274 [15], Seite 10094-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10187790
- Dombrowski, S.; Hoffmann, M.; Kuhn, J.; Brennicke, A. und Binder, S. (1998): On mitochondrial promoters in *Arabidopsis thaliana* and other flowering plants, Möller, I. M.; Glaser, E. und Glimelius, K., *Plant mitochondria* Seite 165-170, Backhuys Publishers, The Netherlands.
- Dombrowski, Saskia; Brennicke, Axel und Binder, Stefan (1997): 3'-Inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators, *EMBO Journal* 16 [16], Seite 5069-5076. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1170141>
- Dower, W. J.; Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res* 16 [13], Seite 6127-6145. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3041370
- DuBell, A. N. und Mullet, J. E. (1995): Differential transcription of pea chloroplast genes during light-induced leaf development, *Plant Physiology* 109 [1], Seite 105-112. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=157567>
- Duchene, A. M. und Marechal-Drouard, L. (2001): The chloroplast-derived *trnW* and *trnM*-e genes are not expressed in Arabidopsis mitochondria, *Biochem Biophys Res Commun* 285 [5], Seite 1213-1216. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11478784
- Edgar, Robert C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32 [5], Seite 1792-1797. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/32/5/1792>
- Edqvist, J. und Bergman, P. (2002): Nuclear identity specifies transcriptional initiation in plant mitochondria, *Plant Mol Biol* 49 [1], Seite 59-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12008899
- Eisermann, A.; Tiller, K. und Link, G. (1990): *In vitro* transcription and DNA binding characteristics of chloroplast and etioplast extracts from mustard (*Sinapis alba*) indicate differential usage of the *psbA* promoter, *EMBO Journal* 9 [12], Seite 3981-3987. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552170>
- Emanuel, Carola; von Groll, Uritza; Müller, Margarete; Börner, Thomas und Weihe, Andreas (2006): Development- and tissue-specific expression of the *RpoT* gene family of *Arabidopsis* encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases, *Planta* 223 [5], Seite 998-1009. URL: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s00425-005-0159-y>
- Emanuel, Carola; Weihe, Andreas; Graner, A.; Hess, W. R. und Börner, T. (2004): Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves, *Plant Journal* 38 [3], Seite 460-472. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.0960-7412.2004.02060.x>
- Emanuelsson, Olof; Nielsen, Henrik; Brunak, Soren und von Heijne, Gunnar (2000): Predicting sub-cellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence, *Journal of Molecular Biology* 300 [4], Seite 1005-1016. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-45F519X-C2/2/736421854f42086afa01fbdb8abe344a>
- Ems, S. C.; Morden, C. W.; Dixon, C. K.; Wolfe, K. H.; DePamphilis, C. W. und Palmer, J. D. (1995): Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana*, *Plant Molecular Biology* 29 [4], Seite 721-33. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8541499>
- Falk, J.; Schmidt, A. und Krupinska, K. (1993): Characterization of plastid DNA transcription in ribosome deficient plastids of heat-bleached barley leaves, *Journal of Plant Physiology* 141 [2], Seite 176-181.
- Falkenberg, M.; Gaspari, M.; Rantanen, A.; Trifunovic, A.; Larsson, N. G. und Gustafsson, C. M. (2002): Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA, *Nat Genet* 31 [3], Seite 289-294. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12068295
- Fargo, D. C.; Zhang, M.; Gillham, N. W. und Boynton, J. E. (1998): Shine-dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*, *Mol Gen Genet* 257 [3], Seite 271-282. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520261>
- Fauron, C.; Casper, M.; Gao, Y. und Moore, B. (1995): The maize mitochondrial genome: dynamic, yet functional, *Trends Genet* 11 [6], Seite 228-235. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7638905
- Fey, J. und Marechal-Drouard, L. (1999): Compilation and analysis of plant mitochondrial promoter sequences: An illustration of a divergent evolution between monocot and dicot mitochondria, *Biochem Biophys Res Commun* 256 [2], Seite 409-414. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10079198
- Fey, J.; Vermel, M.; Grienenberger, J.; Maréchal-Drouard, L. und Gualberto, J.M. (1999): Characterization of a plant mitochondrial active chromosome, *FEBS Letters* 458 [2], Seite 124-8. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=99412176>

- Finnegan, P. M. und Brown, G. G. (1990): Transcriptional and post-transcriptional regulation of RNA levels in maize mitochondria, *Plant Cell* 2 [1], Seite 71-83. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=159865>
- Fischer, N.; Stampacchia, O.; Redding, K. und Rochaix, J.-D. (1996): Selectable marker recycling in the chloroplast, *Mol Gen Genet* 251 [3], Seite 373-380. URL: <http://www.springerlink.com/content/38515132285qk654/>
- Fisher, R. P. und Clayton, D. A. (1985): A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted *in vitro*, *Journal of Biological Chemistry* 260 [20], Seite 11330-11338. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4030791
- Fisher, R. P. und Clayton, D. A. (1988): Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1, *Mol Cell Biol* 8 [8], Seite 3496-3509. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3211148
- Formanova, N. und Brown, G. G. (1997): The maize mitochondrial plasmid RNA b is associated with protein during synthesis but is not encapsidated, *Plant Mol Biol* 34 [3], Seite 383-392. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9225850
- Forner, Joachim; Weber, Barbel; Thuss, Sabine; Wildum, Steffen und Binder, Stefan (2007): Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: t-elements contribute to 5' and 3' end formation, *Nucleic Acids Research* 35 [11], Seite 3676-3692. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/gkm270v1>
- Fujiwara, Makoto; Nagashima, Akimoto; Kanamaru, Kengo; Tanaka, Kan und Takahashi, Hideo (2000): Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Letters* 481 [1], Seite 47-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984613>
- Funnell, B. E.; Baker, T. A. und Kornberg, A. (1987): *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome, *Journal of Biological Chemistry* 262 [21], Seite 10327-10334. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/262/21/10327>
- Gagliardi, D. und Leaver, C. J. (1999): Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower, *EMBO J* 18 [13], Seite 3757-3766. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10393190
- Gagliardi, Dominique und Binder, Stefan (2007): Expression of the Plant Mitochondrial Genome, David, C. Logan, *Plant Mitochondria* Seite 50-96. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470986592.ch3>
- Galli, G.; Hofstetter, H. und Birnstil, M. L. (1981): Two conserved blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements, *Nature* 294, Seite 626-631. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7312050>
- Gardner, J. F. (1982): Initiation, pausing, and termination of transcription in the threonine operon regulatory region of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* 257 [7], Seite 3896-3904. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/257/7/3896>
- Gaspari, M.; Falkenberg, M.; Larsson, N. G. und Gustafsson, C. M. (2004): The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells, *EMBO Journal* 23 [23], Seite 4606-4614. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15526033
- Gatenby, A.A.; Castleton, J.A. und Saul, M.W. (1981): Expression in *E. coli* of maize and wheat chloroplast genes for large subunit of ribulose biphosphate carboxylase, *Nature* 291 [5811], Seite 117-21. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/81197622>
- Gauly, A. und Kössel, H. (1989): Evidence for tissue-specific cytosine-methylation of plastid DNA from *Zea mays*, *Current Genetics* 15 [5], Seite 371-376. URL: <http://www.springerlink.com/content/g5t45632h17870u5/>

- Geiduschek, E.P.; Bardeleben, C.; Joazeiro, C.A.; Kassavetis, G.A. und Whitehall, S. (1995): Yeast RNA polymerase III: transcription complexes and RNA synthesis, *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research* 28 [2], Seite 147-159. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/96059265>
- Giegé, P. und Brennicke, A. (1999): RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 [26], Seite 15324-15329. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20079652>
- Giegé, P.; Hoffmann, M.; Binder, S. und Brennicke, A. (2000): RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria, *EMBO Reports* 1 [2], Seite 164-170. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11265757
- Giegé, Philippe; Sweetlove, Lee J.; Cognat, Valerie und Leaver, Christopher J. (2005): Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in Arabidopsis, *Plant Cell* 17 [5], Seite 1497-1512. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/17/5/1497>
- Giese, A.; Thalheim, C.; Brennicke, A. und Binder, S. (1996): Correlation of nonanucleotide motifs with transcript initiation of 18S rRNA genes in mitochondria of pea, potato and Arabidopsis, *Molecular and General Genetics* 252 [4], Seite 429-36. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=97033547>
- Gillham, N. W.; Boynton, J. E. und Hauser, C. R. (1994): Translational Regulation of Gene Expression in Chloroplasts and Mitochondria, *Annual Review of Genetics* 28 [1], Seite 71-93. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/loi/genet>
- Gray, John C. (2003): Chloroplast-to-nucleus signalling: a role for Mg-protoporphyrin, *Trends in Genetics* 19 [10], Seite 526-529. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCY-49D6Y6W-1/2/6b56ff9a376bd23900d709f3f4cad349>
- Gray, M. W. (1992): The endosymbiont hypothesis revisited, *Int Rev Cytol* 141, Seite 233-357. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1452433
- Gray, M. W. (1999): Evolution of organellar genomes, *Curr Opin Genet Dev* 9 [6], Seite 678-687. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10607615
- Gray, M.W. und Lang, B.F. (1998): Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases, *Trends In Microbiology* 6 [1], Seite 1-3. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98142813>
- Greenberg, B. M.; Gaba, V.; Canaani, O.; Malkin, S.; Mattoo, A. K. und Edelman, M. (1989): Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 [17], Seite 6617-6620. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2671998
- Greenleaf, A. L.; Kelly, J. L. und Lehman, I. R. (1986): Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 [10], Seite 3391-3394. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3517858
- Gruissem, W und Tonkyn, J. C. (1993): Control mechanisms of plastid gene expression, *Critical Reviews in Plant Sciences* 12, Seite 19-55.
- Gruissem, W.; Elsner-Menzel, C.; Latshaw, S.; Narita, J. O.; Schaffer, M. A. und Zurawski, G. (1986): A subpopulation of spinach chloroplast tRNA genes does not require upstream promoter elements for transcription, *Nucleic Acids Research* 14 [19], Seite 7541-7556. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=311779>
- Gruissem, W.; Greenberg, B. M.; Zurawski, G. und Hallick, R. B. (1986): Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts, *Methods in Enzymology* 118, Seite 253-270. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419734>

- Hajdukiewicz, P. T.; Allison, L. A. und Maliga, P. (1997): The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids, *EMBO Journal* 16 [13], Seite 4041-4048. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9233813
- Hakimi, M.A.; Privat, I.; Valay, J.G. und Lerbs-Mache, S. (2000): Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma⁷⁰-type transcription factors between plants and bacteria, *Journal of Biological Chemistry* 275 [13], Seite 9215-21. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20200404>
- Han, C. -d.; Patrie, W.; Polacco, M.; Coe, E. H. und Jr (1993): Aberrations in plastid transcripts and deficiency of plastid DNA in striped and albino mutants in maize, *Planta* 191, Seite 552-563.
- Hanaoka, M.; Kanamaru, K.; Fujiwara, M.; Takahashi, H. und Tanaka, K. (2005): Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis, *EMBO Reports* 6 [6], Seite 545-550. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15877080
- Hanaoka, Mitsumasa; Kanamaru, Kengo; Takahashi, Hideo und Tanaka, Kan (2003): Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in *Arabidopsis thaliana*, *Nucleic Acids Research* 31 [24], Seite 7090-7098. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/31/24/7090>
- Handa, Hirokazu (2003): The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*, *Nucleic Acids Research* 31 [20], Seite 5907-5916. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/31/20/5907>
- Hanic-Joyce, P. J. und Gray, M. W. (1991): Accurate transcription of a plant mitochondrial gene *in vitro*, *Molecular & Cellular Biology* 11 [4], Seite 2035-9. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=359890>
- Hara, K.; Morita, M.; Takahashi, R.; Sugita, M.; Kato, S. und Aoki, S. (2001): Characterization of two genes, *Sig1* and *Sig2*, encoding distinct plastid sigma factors(1) in the moss *Physcomitrella patens*: phylogenetic relationships to plastid sigma factors in higher plants, *FEBS Letters* 499 [1-2], Seite 87-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11418118
- Hartvig, L. und Christiansen, J. (1996): Intrinsic termination of T7 RNA polymerase mediated by either RNA or DNA, *EMBO Journal* 15 [17], Seite 4767-4774. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8887568>
- Hashimoto, Masaru; Murakamia, Takanori; Funahashia, Katsuyuki; Tokunagaa, Takashi; Niheia, Ken-ichi; Okunod, Toshikatsu; Kimuraa, Takatsugu; Naokic, Hideo und Himenoa, Hyouta (2006): An RNA polymerase inhibitor, cyclothiazomycin B1, and its isomer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 [24], Seite 8259-8270. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17010619>
- Hatfield, G. Wesley und Benham, Craig J. (2002): DNA Topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*, *Annual Review of Genetics* 36 [1], Seite 175-203. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.36.032902.111815>
- Hatzack, F.; Dombrowski, S.; Brennicke, A. und Binder, S. (1998): Characterization of DNA-binding proteins from pea mitochondria, *Plant Physiology* 116 [2], Seite 519-527. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=35109>
- Hazle, Thomas und Bonen, Linda (2007): Comparative Analysis of Sequences Preceding Protein-Coding Mitochondrial Genes in Flowering Plants, *Molecular Biology and Evolution* 24 [5], Seite 1101-1112. URL: <http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/msm030v1>
- He, B.; Kukarin, A.; Temiakov, D.; Chin-Bow, S. T.; Lyakhov, D. L.; Rong, M.; Durbin, R. K. und McAllister, W. T. (1998): Characterization of an unusual, sequence-specific termination signal for T7 RNA polymerase, *J Biol Chem* 273 [30], Seite 18802-18811. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9668054

- Hedtke, B.; Börner, T. und Weihe, A. (1997): Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*, *Science* 277 [5327], Seite 809-811. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97390506>
- Hedtke, B.; Börner, T. und Weihe, A. (2000): One RNA polymerase serving two genomes, *EMBO Reports* 1 [5], Seite 435-440. URL: <http://www.nature.com/embor/journal/v1/n5/abs/embor552.html>
- Hedtke, Boris; Legen, Julia; Weihe, Andreas; Herrmann, Reinhold G. und Börner, Thomas (2002): Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*, *Plant Journal* 30 [6], Seite 625-637. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118956991/abstract>
- Hedtke, Boris; Meixner, Martin; Gillandt, Sabine; Richter, Ekkehard; Börner, Thomas und Weihe, Andreas (1999): Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*, *Plant Journal* 17 [5], Seite 557-561. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10205908>
- Heinhorst, S.; Chi-Ham, C.L.; Adamson, S.W. und Cannon, G.C. (2004): The somatic inheritance of plant organelles, Daniell, Henry und Chase, Christine D., *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles* Seite 37-92, Springer, Dordrecht. URL: <http://www.springerlink.com/content/k3nt3vu1n58u5277/>
- Hellmund, D.; Metzlaff, M. und Serfling, E. (1984): A transfer RNA^{Arg} gene of *Pelargonium* chloroplasts, but not a 5S RNA gene, is efficiently transcribed after injection into *Xenopus* oocyte nuclei, *Nucleic Acids Research* 12 [21], Seite 8253-8268. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6209611
- Herrmann, J. M. (2003): Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting, *Trends Microbiol* 11 [2], Seite 74-79. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12598129
- Herrmann, R.G. (1997): Eukaryotism, towards a new interpretation., Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E., Schwemmler, W., *Eukaryotism and Symbiosis* Seite 73-118, Springer Heidelberg, New York.
- Herrmann, RG; HJ, Bohnert; KV, Kowallik und JM, Schmitt (1975): Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants., *Biochim Biophys Acta* 378 [2], Seite 305-317.
- Herz, Stefan; Füßl, Monika; Steiger, Sandra und Koop, Hans-Ulrich (2005): Development of Novel Types of Plastid Transformation Vectors and Evaluation of Factors Controlling Expression, *Transgenic Research* 14 [6], Seite 969-982. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-005-2542-7>
- Hess, W. R. ; Prombona, A. ; Fieder, B. ; Subramanian, A. R. und Börner, T. (1993): Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase, *EMBO Journal* 12 [2], Seite 563-71. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=413239&blobtype=pdf>
- Hess, W. R.; Blank-Huber, M.; Fieder, B.; Börner, T. und Rüdiger, W. (1992): Chlorophyll synthetase and chloroplast tRNA^{Glu} are present in heat-induced, ribosome-deficient plastids., *Journal of Plant Physiology* 139, Seite 427-430.
- Hess, W.R. und Börner, T. (1999): Organellar RNA polymerases in higher plants, *Int Rev Cyt* 190, Seite 1-59. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331238>
- Hirata, N.; Yonekura, D.; Yanagisawa, S. und Iba, K. (2004): Possible involvement of the 5'-flanking region and the 5'UTR of plastid *accD* gene in NEP-dependent transcription, *Plant Cell Physiology* 45 [2], Seite 176-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14988488
- Hirose, Tetsuro und Sugiura, Masahiro (2004): Functional Shine-Dalgarno-Like sequences for translational initiation of chloroplast mRNAs, *Plant Cell Physiology* 45 [1], Seite 114-117. URL: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/45/1/114>
- Hirose, Tetsuro und Sugiura, Masahiro (2004): Multiple elements required for translation of plastid *atpB* mRNA lacking the Shine-Dalgarno sequence, *Nucleic Acids Research* 32 [11], Seite 3503-3510. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/32/11/3503>

- Hoffer, P.H. und Christopher, D.A. (1997): Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast *psbD* promoter from *Arabidopsis thaliana*, Plant Physiology 115 [1], Seite 213-222. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97451778>
- Hoffmann, M. und Binder, S. (2002): Functional importance of nucleotide identities within the pea *atp9* mitochondrial promoter sequence, J Mol Biol 320 [5], Seite 943-950. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12126616
- Holec, S.; Lange, H.; Kühn, K.; Alioua, M.; Börner, T. und Gagliardi, D. (2006): Relaxed transcription in *Arabidopsis* mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase, Molecular and Cellular Biology 26 [7], Seite 2869-2876. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16537927
- Homann, A. und Link, G. (2003): DNA-binding and transcription characteristics of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression., European Journal of Biochemistry 270 [6], Seite 1288-1300. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.22518521>
- Hricová, Andrea; Quesada, Victor und Micol, Jose Luis (2006): The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in Arabidopsis, Plant Physiology 141 [3], Seite 942-956. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/141/3/942>
- Hu, J. und Bogorad, L. (1990): Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87 [4], Seite 1531-1535. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53509>
- Hu, J. ; Troxler, R. F. und Bogorad, L. (1991): Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene, Nucleic Acids Research 19 [12], Seite 3431-3434. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=328344>
- Hübschmann, T. und Börner, T. (1998): Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids, Plant Molecular Biology 36 [3], Seite 493-6. URL: <http://www.springerlink.com/content/1561n176x08343pt/fulltext.pdf>
- Hudson, G. S.; Holton, D. A.; Whitfeld, P. R. und Bottomley, W. (1988): Spinach chloroplast *rpoBC* genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase, J Mol Biol 200 [4], Seite 639-654. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3045324>
- Iamtham, Siriluck und Day, Anil (2000): Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids, Nature Biotechnology 18 [11], Seite 1172-1176. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/81161>
- Igloi, G.L. und Kössel, H. (1992): The transcriptional apparatus of chloroplasts, Critical Reviews in Plant Sciences 10, Seite 525-558.
- Ikeda, T. und Gray, M. (1999): Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria, Molecular and Cellular Biology 19 [12], Seite 8113-8122. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/19/12/8113>
- Ikeda, T. M. und Gray, M. W. (1999): Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat, Plant Mol Biol 40 [4], Seite 567-578. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10480381
- Inada, H. ; Seki, M. ; Morikawa, H. ; Nishimura, M. und Iba, K. (1997): Existence of three regulatory regions each containing a highly conserved motif in the promoter of plastid-encoded RNA polymerase gene (*rpoB*), Plant Journal 11 [4], Seite 883-890. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-3113X.1997.11040883.x>
- Iratni, R. ; Diederich, L. ; Harrak, H. ; Bligny, M. und Lerbs-Mache, S. (1997): Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids, Journal of Biological Chemistry 272 [21], Seite 13676-13682. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/272/21/13676>
- Iratni, R.; Baeza, L.; Andreeva, A.; Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1994): Regulation of rDNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by constitutive repression, Genes Dev 8 [23], Seite 2928-2938. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7995527
- Isono, K. ; Niwa, Y. ; Satoh, K. und Kobayashi, H. (1997): Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots, *Plant Physiology* 114 [2], Seite 623-630. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/114/2/623>
- Isono, K.; Shimizu, M.; Yoshimoto, K.; Niwa, Y.; Satoh, K.; Yokota, A. und Kobayashi, H. (1997): Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of sigma70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 94 [26], Seite 14948-14953. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98070858>
- Jaehning, J.A. (1993): Mitochondrial transcription: is a pattern emerging?, *Molecular Microbiology* 8 [1], Seite 1-4. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/93268084>
- Jahn, D. (1992): Expression of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast tRNA(Glu) gene in a homologous *in vitro* transcription system is independent of upstream promoter elements, *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 298 [2], Seite 505-513. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/93037487>
- Jang, S. H. und Jaehning, J. A. (1991): The yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, MTF1, is similar to bacterial sigma factors, *J Biol Chem* 266 [33], Seite 22671-22677. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1939277
- Jeng, S. T.; Gardner, J. F. und Gumpert, R. I. (1990): Transcription termination by bacteriophage T7 RNA polymerase at rho-independent terminators, *Journal of Biological Chemistry* 265 [7], Seite 3823-3830. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2406263
- Jeng, S. T.; Gardner, J. F. und Gumpert, R. I. (1992): Transcription termination *in vitro* by bacteriophage T7 RNA polymerase. The role of sequence elements within and surrounding a rho-independent transcription terminator, *Journal of Biological Chemistry* 267 [27], Seite 19306-19312. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1527050
- Johnson, J. M.; Edwards, S.; Shoemaker, D. und Schadt, E. E. (2005): Dark matter in the genome: evidence of widespread transcription detected by microarray tiling experiments, *Trends Genet* 21 [2], Seite 93-102. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15661355
- Jukes, T.H. und Cantor, C.R. (1969): *Evolution of protein molecules*, Munro, HN, Mammalian Protein Metabolism Seite 21-132, Academic Press, New York.
- Kabeya, Y. und Sato, N. (2005): Unique translation initiation at the second AUG codon determines mitochondrial localization of the phage-type RNA polymerases in the moss *Physcomitrella patens*, *Plant Physiology* 138 [1], Seite 369-382. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15834007
- Kabeya, Yukihiro; Hashimoto, Kazuyoshi und Sato, Naoki (2002): Identification and characterization of two phage-type RNA polymerase cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*: implication of recent evolution of nuclear-encoded RNA polymerase of plastids in plants, *Plant Cell Physiology* 43 [3], Seite 245-255. URL: <http://pcp.oupjournals.org/cgi/content/abstract/43/3/245>
- Kanamaru, K.; Nagashima, A.; Fujiwara, M.; Shimada, H.; Shirano, Y.; Nakabayashi, K.; Shibata, D.; Tanaka, K. und Takahashi, H. (2001): An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts, *Plant Cell Physiology* 42 [10], Seite 1034-1043. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11673617
- Kanamaru, Kengo; Fujiwara, Makoto; Seki, Motoaki; Katagiri, Takeshi; Nakamura, Masanobu; Mochizuki, Nobuyoshi; Nagatani, Akira; Shinozaki, Kazuo; Tanaka, Kan und Takahashi, Hideo

- (1999): Plastidic RNA polymerase sigma factors in Arabidopsis, *Plant & Cell Physiology* 40 [8], Seite 832-842. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555304>
- Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirose, M.; Sugiura, M.; Sasamoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Naruo, K.; Okumura, S.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Wada, T.; Watanabe, A.; Yamada, M.; Yasuda, M. und Tabata, S. (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions, *DNA Research* 3 [3], Seite 109-136. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97061201>
- Kanki, Tomotake; Ohgaki, Kippei; Gaspari, Martina; Gustafsson, Claes M.; Fukuoh, Atsushi; Sasaki, Narie; Hamasaki, Naotaka und Kang, Dongchon (2004): Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA, *Molecular & Cellular Biology* 24 [22], Seite 9823-9834. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/24/22/9823>
- Kapoor, S. und Sugiura, M. (1999): Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus Type II *PatpB*-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells., *Plant Cell* 11 [9], Seite 1799-1810. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=144303>
- Kapoor, S.; Suzuki, J. Y. und Sugiura, M. (1997): Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters, *Plant Journal* 11 [2], Seite 327-337. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119158825/abstract>
- Kestermann, M.; Neukirchen, S.; Kloppstech, K. und Link, G. (1998): Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*), *Nucleic Acids Research* 26 [11], Seite 2747-2753. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147615>
- Kim, M. und Mullet, J. E. (1995): Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive *psbD-psbC* promoter, *Plant Cell* 7 [9], Seite 1445-1457. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=160969>
- Kim, M.; Thum, K.E.; Morishige, D.T. und Mullet, J.E. (1999): Detailed architecture of the barley chloroplast *psbD-psbC* blue light-responsive promoter, *Journal of Biological Chemistry* 274 [8], Seite 4684-4692. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/99143125>
- Kobayashi, H.; Ngernprasirtsiri, J. und Akazawa, T. (1990): Transcriptional regulation and DNA methylation in plastids during transitional conversion of chloroplasts to chromoplasts, *EMBO Journal* 9 [2], Seite 307-313. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/90151602>
- Kobayashi, T.; Takahara, M.; Miyagishima, S. Y.; Kuroiwa, H.; Sasaki, N.; Ohta, N.; Matsuzaki, M. und Kuroiwa, T. (2002): Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids, *Plant Cell* 14 [7], Seite 1579-1589. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12119376
- Kobayashi, Y.; Dokiya, Y.; Kumazawa, Y. und Sugita, M. (2002): Non-AUG translation initiation of mRNA encoding plastid-targeted phage-type RNA polymerase in *Nicotiana glauca*, *Biochem Biophys Res Commun* 299 [1], Seite 57-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12435389
- Kobayashi, Y.; Dokiya, Y. und Sugita, M. (2001): Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts, *Biochem Biophys Res Commun* 289 [5], Seite 1106-1113. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11741306
- Kolodner, Richard und Tewari, K. K. (1972): Molecular Size and Conformation of Chloroplast Deoxyribonucleic Acid from Pea Leaves, *Journal of Biological Chemistry* 247 [19], Seite 6355-6364. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/247/19/6355>
- Konarska, Maria M. und Sharp, Phillip A. (1989): Replication of RNA by the DNA-dependent RNA polymerase of phage T7, *Cell* 57 [3], Seite 423-431. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4C6BN4V-3J/2/5f1747f498f8ba78b85ec03c3e104572>

- Konarska, Maria M. und Sharp, Phillip A. (1990): Structure of RNAs replicated by the DNA-dependent T7 RNA polymerase, *Cell* 63 [3], Seite 609-618. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4C592Y4-7B/2/bad4bd25111d2f9f5bdb543237ede335>
- Kruse, Brigitte; Narasimhan, Nalini und Attardi, Giuseppe (1989): Termination of transcription in human mitochondria: Identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination, *Cell* 58 [2], Seite 391-397. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867489908532>
- Kubo, T.; Nishizawa, S.; Sugawara, A.; Itchoda, N.; Estiati, A. und Mikami, T. (2000): The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA), *Nucleic Acids Research* 28 [13], Seite 2571-2576. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10871408
- Kühn, Kristina (2001): T7-phagenverwandte Transkriptionssysteme in *Arabidopsis thaliana*: Funktionelle Charakterisierung rekombinanter Komponenten, Humboldt Universität, Berlin.
- Kühn, Kristina (2005): Analysis of components of the mitochondrial transcription machinery in *Arabidopsis thaliana*, Humboldt-Universität, Berlin.
- Kühn, Kristina; Bohne, Alexandra-Viola; Liere, Karsten; Weihe, Andreas und Börner, Thomas (2007): *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate *in vitro* transcription of organellar genes, *Plant Cell* 19 [3], Seite 959-971. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/19/3/959>
- Kühn, Kristina; Weihe, Andreas und Börner, Thomas (2005): Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*, *Nucleic Acids Research* 33 [1], Seite 337-346. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/33/1/337>
- Kusumi, K.; Yara, A.; Mitsui, N.; Tozawa, Y. und Iba, K. (2004): Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp*, *Plant Cell Physiology* 45 [9], Seite 1194-201. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15509842
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], Seite 680-685. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>
- Lahiri, S. D. und Allison, L. A. (2000): Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize, *Plant Physiology* 123 [3], Seite 883-894. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/123/3/883>
- Lang, B.F.; Burger, G.; O'Kelly, C.J.; Cedergren, R.; Golding, G.B.; Lemieux, C.; Sankoff, D.; Turmel, M. und Gray, M.W. (1997): An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature, *Nature* 387 [6632], Seite 493-7. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97311393>
- Lecrenier, N. und Foury, F. (2000): New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man, *Gene* 246 [(1-2)], Seite 37-48. URL: <http://www.ingentaconnect.com/content/els/03781119/2000/00000246/00000001/art00107>
- Leino, Matti ; Landgren, Maria und Glimelius, Kristina (2005): Alloplasmic effects on mitochondrial transcriptional activity and RNA turnover result in accumulated transcripts of *Arabidopsis* orfs in cytoplasmic male-sterile *Brassica napus*, *Plant Journal* 42 [4], Seite 469-480. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02389.x>
- Leister, D. (2005): Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA, *Trends Genet* 21 [12], Seite 655-663. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16216380
- Leon, P.; Arroyo, A. und Mackenzie, S. (1998): Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49 [1], Seite 453-480. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/loi/arplant>
- Lerbs-Mache, S. (1993): The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 [12], Seite 5509-5513. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46750>

- Lerbs, S.; Briat, J. F. und Mache, R. (1983): Chloroplast RNA polymerase from spinach: purification and DNA-binding proteins, *Plant Molecular Biology* 2 [2], Seite 67-74. URL: <http://www.springerlink.com/content/n321742837731573/>
- Li, X. Q.; Zhang, M. und Brown, G. G. (1996): Cell-specific expression of mitochondrial transcripts in maize seedlings, *Plant Cell* 8 [11], Seite 1961-1975. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/8/11/1961>
- Liere, K. und Link, G. (1994): Structure and expression characteristics of the chloroplast DNA region containing the split gene for tRNA(Gly) (UCC) from mustard (*Sinapis alba* L.), *Current Genetics* 26 [5-6], Seite 557-563. URL: <http://www.springerlink.com/content/p32q6k34nx31g323/>
- Liere, K. und Maliga, P. (1999): *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters, *EMBO Journal* 18 [1], Seite 249-257. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/99094909>
- Liere, K. und Maliga, P. (2001): Plastid RNA polymerases in higher plants, Andersson, B. und Aro, E.-M., *Regulatory aspects of photosynthesis* Seite 29-49, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007): Transcription and transcriptional regulation in plastids, Bock, Ralph, *Topics in Current Genetics: Cell and Molecular Biology of Plastids* 19 Seite 121-174, Springer, Berlin / Heidelberg. URL: <http://www.springerlink.com/content/j7r616r40g487337/>
- Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007): Transcription of Plastid Genes, Grasser, Klaus D., *Regulation of Transcription in Plants* Seite 184-224, Blackwell Publishing Ltd, Oxford. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470988886.ch8>
- Liere, Karsten; Kaden, Daniela; Maliga, Pal und Börner, Thomas (2004): Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type, *Nucleic Acids Research* 32 [3], Seite 1159-1165. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/32/3/1159>
- Liere, Karsten und Maliga, Pal (1999): Novel *in vitro* transcription assay indicates that the *accD* NEP promoter is contained in a 19 bp fragment., Argyroudi-Akoyunoglou, J. H. und Senger, H., *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology* Seite 79-84, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.
- Linder, Tomas; Park, Chan; Asin-Cayuela, Jordi; Pellegrini, Mina; Larsson, Nils-Göran; Falkenberg, Maria; Samuelsson, Tore und Gustafsson, Claes (2005): A family of putative transcription termination factors shared amongst metazoans and plants, *Current Genetics* 48 [4], Seite 265-269. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-005-0022-5>
- Link, G. (1984): DNA sequence requirements for the accurate transcription of a protein-coding plastid gene in a plastid *in vitro* transcription system from mustard (*Sinapis alba* L.), *EMBO Journal* 3 [8], Seite 1697-1704. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=557584>
- Link, G. (1996): Green life: control of chloroplast gene transcription, *BioEssays* 18 [6], Seite 465-471. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/109913555/abstract>
- Little, M. C. und Hallick, R. B. (1988): Chloroplast *rpoA*, *rpoB*, and *rpoC* genes specify at least three components of a chloroplast DNA-dependent RNA polymerase active in tRNA and mRNA transcription, *Journal of Biological Chemistry* 263 [28], Seite 14302-14307. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/263/28/14302>
- Loguercio Polosa, P. ; Roberti, M.; Musicco, C.; Gadaleta, M. N. ; E., Quagliariello und Cantatore, P. (1999): Cloning and characterisation of mtDBP, a DNA-binding protein which binds two distinct regions of sea urchin mitochondrial DNA, *Nucleic Acids Research* 27 [8], Seite 1890-1899. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/27/8/1890>
- Lupold, D. S.; Caoile, A. G. und Stern, D. B. (1999): Genomic context influences the activity of maize mitochondrial *cox2* promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [20], Seite 11670-11675. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10500235
- Lupold, D. S.; Caoile, A. G. und Stern, D. B. (1999): The maize mitochondrial *cox2* gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units, *J Biol Chem* 274 [6], Seite 3897-3903. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9920945
- Lurin, C.; Andres, C.; Aubourg, S.; Bellaoui, M.; Bitton, F.; Bruyere, C.; Caboche, M.; Debast, C.; Gualberto, J.; Hoffmann, B.; Lecharny, A.; Le Ret, M.; Martin-Magniette, M. L.; Mireau, H.; Peeters, N.; Renou, J. P.; Szurek, B.; Taconnat, L. und Small, I. (2004): Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis, *Plant Cell* 16 [8], Seite 2089-2103. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15269332
- Lyakhov, Dmitry L.; He, Biao; Zhang, Xing; Studier, F. William; Dunn, John J. und McAllister, William T. (1998): Pausing and termination by bacteriophage T7 RNA polymerase, *Journal of Molecular Biology* 280 [2], Seite 201-213. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-45S49FF-92/2/c1271e8880b059178cc1ecb4b80ae624>
- Lysenko, Eugene (2007): Plant sigma factors and their role in plastid transcription, *Plant Cell Reports* 26 [7], Seite 845-859. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-007-0318-7>
- Macdonald, Lynn E.; Durbin, Russell K.; Dunn, John J. und McAllister, William T. (1994): Characterization of two types of termination signal for bacteriophage T7 RNA polymerase, *Journal of Molecular Biology* 238 [2], Seite 145-158. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-45NSJWC-DB/2/72883d35b0d66e05fb6c6fedc5121e52>
- Maier, R. M. und Schmitz-Linneweber, C. (2004): Plastid genomes, Daniell, Henry und Chase, Christine D., *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles* Seite 115-150, Springer, Dordrecht.
- Mangus, D. A. ; Jang, S. H. und Jaehning, J. A. (1994): Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes, *Journal of Biological Chemistry* 269 [42], Seite 26568-26574. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/269/42/26568>
- Marechal-Drouard, L.; Weil, J. H. und Dietrich, A. (1993): Transfer RNAs and transfer RNA genes in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44 [1], Seite 13-32. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.44.060193.000305>
- Marienfeld, Joachim; Unseld, Michael und Brennicke, Axel (1999): The mitochondrial genome of Arabidopsis is composed of both native and immigrant information, *Trends in Plant Science* 4 [12], Seite 495-502. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TD1-3XY1H0Y-8/2/a800ecf4aaf00b19798c2170ab2bb7ea>
- Martin, Miguel; Cho, Jaehyoung; Cesare, Anthony J.; Griffith, Jack D. und Attardi, Giuseppe (2005): Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis, *Cell* 123 [7], Seite 1227-1240. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867405011700>
- Martin, W. (2003): Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 [15], Seite 8612-8614. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12861078
- Martin, William und Herrmann, Reinhold G. (1998): Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why?, *Plant Physiology* 118 [1], Seite 9-17. URL: <http://www.plantphysiol.org>
- Martin, William; Rujan, Tamas; Richly, Erik; Hansen, Andrea; Cornelsen, Sabine; Lins, Thomas; Leister, Dario; Stoebe, Bettina; Hasegawa, Masami und Penny, David (2002): Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 [19], Seite 12246-12251. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/99/19/12246>
- Masters, B. S.; Stohl, L. L. und Clayton, D. A. (1987): Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7, *Cell* 51 [1], Seite 89-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3308116

- Matsunaga, Michio und Jaehning, Judith A. (2004): Intrinsic promoter recognition by a "core" RNA polymerase, *Journal of Biological Chemistry* 279 [43], Seite 44239-44242. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/279/43/44239>
- Mayfield, S. P.; Yohn, C. B.; Cohen, A. und Danon, A. (1995): Regulation of chloroplast gene expression, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46, Seite 147-166. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.46.060195.001051>
- McAllister, WT. und Raskin, CA. (1993): The phage RNA polymerases are related to DNA polymerases and reverse transcriptases, *Molecular Microbiology* 10 [1], Seite 1-6. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119307618/abstract>
- McCulloch, V. und Shadel, G. S. (2003): Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity, *Mol Cell Biol* 23 [16], Seite 5816-5824. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12897151
- McCulloch, Vicki; Seidel-Rogol, Bonnie L. und Shadel, Gerald S. (2002): A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine, *Molecular & Cellular Biology* 22 [4], Seite 1116-1125. URL: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/22/4/1116>
- McFadden, Geoffrey Ian (2001): Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids, *Journal of Phycology* 37 [6], Seite 951-959. URL: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01126.x>
- Meng, B. Y.; Wakasugi, T. und Sugiura, M. (1991): Two promoters within the *psbK-psbI-trnG* gene cluster in tobacco chloroplast DNA, *Current Genetics* 20 [3], Seite 259-264. URL: <http://www.springerlink.com/content/p7217403h44q5181/>
- Mereschowsky, C. (1905): Über die Natur und den Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche., *Biologisches Zentralblatt* 25, Seite 593-604
- Millar, A. H.; Day, A. D. und Whelan, J. (2004): Mitochondrial biogenesis and function in *Arabidopsis*, Somerville, C. R. und Meyerowitz, E. M., *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. URL: <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Miyagi, T.; Kapoor, S.; Sugita, M. und Sugiura, M. (1998): Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence, *Molecular And General Genetics* 257 [3], Seite 299-307. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98179086>
- Mochizuki, T.; Onda, Y.; Fujiwara, E.; Wada, M. und Toyoshima, Y. (2004): Two independent light signals cooperate in the activation of the plastid *psbD* blue light-responsive promoter in *Arabidopsis*, *FEBS Letters* 571 [1-3], Seite 26-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15280012
- Monde, R.A.; Schuster, G. und Stern, D.B. (2000): Processing and degradation of chloroplast mRNA, *Biochimie* 82 [6-7], Seite 573-82. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20405538>
- Moneger, F.; Smart, C. J. und Leaver, C. J. (1994): Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene, *EMBO J* 13 [1], Seite 8-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8306974
- Morales, P.; Rouviere-Yaniv, J. und Dreyfus, M. (2002): The histone-like protein HU does not obstruct movement of T7 RNA polymerase in *Escherichia coli* cells but stimulates its activity, *Journal of Bacteriology* 184 [6], Seite 1565-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11872707
- Mueller, D. M. und Getz, G. S. (1986): Steady state analysis of mitochondrial RNA after growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* under catabolite repression and derepression, *J. Biol. Chem.* 261 [25], Seite 11816-11822. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/261/25/11816>
- Mukherjee, S.; Brieba, L. G. und Sousa, R. (2003): Discontinuous movement and conformational change during pausing and termination by T7 RNA polymerase, *EMBO Journal* 22 [24], Seite

- 6483-6493. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14657021
- Mullet, J. E. (1993): Dynamic regulation of chloroplast transcription., Plant Physiology 103 [2], Seite 309-313. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/103/2/309>
- Mullet, J. E. und Klein, R. R. (1987): Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels, EMBO Journal 6 [6], Seite 1571-1579. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16453773>
- Mulligan, R. M.; Lau, G. T. und Walbot, V. (1988): Numerous transcription initiation sites exist for the maize mitochondrial genes for subunit 9 of the ATP synthase and subunit 3 of cytochrome oxidase, Proc Natl Acad Sci U S A 85 [21], Seite 7998-8002. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2903498
- Mulligan, R. M.; Leon, P. und Walbot, V. (1991): Transcriptional and posttranscriptional regulation of maize mitochondrial gene expression, Mol Cell Biol 11 [1], Seite 533-543. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1846025
- Mulligan, RM (2004): RNA editing in plant organelles, Daniell, H. und Chase, C., Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles Seite 239–260, Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Murray, M. G. und Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic Acids Research 8 [19], Seite 4321-4325. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7433111
- Nagashima, A.; Hanaoka, M.; Shikanai, T.; Fujiwara, M.; Kanamaru, K.; Takahashi, H. und Tanaka, K. (2004): The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the *psbD* blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*, Plant Cell Physiology 45 [4], Seite 357-368. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15111710
- Nakamura, Takahiro; Furuhashi, Yumiko; Hasegawa, Keiko; Hashimoto, Hiroshi; Watanabe, Kazufumi; Obokata, Junichi; Sugita, Mamoru und Sugiura, Masahiro (2003): Array-based analysis on tobacco plastid transcripts: Preparation of a genomic microarray containing all genes and all intergenic regions, Plant and Cell Physiology 44 [8], Seite 861-867. URL: <http://pcp.oupjournals.org/cgi/content/abstract/44/8/861>
- Neuhaus, H. und Link, G. (1990): The chloroplast *psbK* operon from mustard (*Sinapis alba* L.): multiple transcripts during seedling development and evidence for divergent overlapping transcription, Current Genetics 18 [4], Seite 377-383. URL: <http://www.springerlink.com/content/np153220428qu483/>
- Newton, K.J.; Winberg, B.; Yamato, K.; Lupold, S. und Stern, D.B. (1995): Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the *cox2* gene of perennial teosintes, EMBO Journal 14 [3], Seite 585-93. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/95163591>
- Ngernprasirtsiri, J. und Akazawa, T. (1990): Modulation of DNA methylation and gene expression in cultured sycamore cells treated by hypomethylating base analog, European Journal Of Biochemistry 194 [2], Seite 513-20. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/91099326>
- Ngernprasirtsiri, J.; Chollet, R.; Kobayashi, H.; Sugiyama, T. und Akazawa, T. (1989): DNA methylation and the differential expression of C4 photosynthesis genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves, Journal of Biological Chemistry 264 [14], Seite 8241-8. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/89255262>
- Nickelsen, J. und Link, G. (1990): Nucleotide sequence of the mustard chloroplast genes *trnH* and *rps19'*, Nucleic Acids Research 18 [4], Seite 1051. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=330368>
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S. und von Heijne, G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, Protein Eng 10 [1], Seite 1-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9051728

- Notsu, Y.; Masood, S.; Nishikawa, T.; Kubo, N.; Akiduki, G.; Nakazono, M.; Hirai, A. und Kadowaki, K. (2002): The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants, *Mol Genet Genomics* 268 [4], Seite 434-445. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12471441
- Ogrzewalla, K.; Piotrowski, M.; Reinbothe, S. und Link, G. (2002): The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function., *European Journal of Biochemistry* 269 [13], Seite 3329-3337. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.22079446>
- Oikawa, K.; Fujiwara, M.; Nakazato, E.; Tanaka, K. und Takahashi, H. (2000): Characterization of two plastid sigma factors, SigA1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacum*, *Gene* 261 [2], Seite 221-228. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11167008
- Oldenburg, D. J. und Bendich, A. J. (2004): Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms, *Journal of Molecular Biology* 335 [4], Seite 953-970. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14698291
- Palmer, J. D. (1990): Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles, *Trends in Genetics* 6 [4], Seite 115-120.
- Palmer, J. D.; Adams, K. L.; Cho, Y.; Parkinson, C. L.; Qiu, Y. L. und Song, K. (2000): Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [13], Seite 6960-6966. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10860957
- Park, Ae Kyung ; Kim, Ho und Jin, Hyung Jong (2009): Comprehensive phylogenetic analysis of evolutionarily conserved rRNA adenine dimethyltransferase suggests diverse bacterial contributions to the nucleus-encoded plastid proteome, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50 [2], Seite 282-289. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WNH-4TVHSN8-3&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=3c3faf3bc37c6f91b1e1b67855328163
- Perrin, Romary; Meyer, Etienne H.; Zaepfel, Marlyse; Kim, Yean-Jung; Mache, Regis; Grienemberger, Jean-Michel; Gualberto, Jose M. und Gagliardi, Dominique (2004): Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3'-ends of *atp9* mRNAs in arabidopsis mitochondria, *Journal of Biological Chemistry* 279 [24], Seite 25440-25446. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/279/24/25440>
- Pesaresi, Paolo; Schneider, Anja; Kleine, Tatjana und Leister, Dario (2007): Interorganellar communication Current Opinion in Plant Biology 10 [6], Seite 600-606. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719262?ordinalpos=5&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum
- Peter, Brian; Arsuaga, Javier; Breier, Adam; Khodursky, Arkady; Brown, Patrick und Cozzarelli, Nicholas (2004): Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*, *Genome Biology* 5 [11], Seite R87. URL: <http://genomebiology.com/2004/5/11/R87>
- Pfalz, Jeannette; Liere, Karsten; Kandlbinder, Andrea; Dietz, Karl-Josef und Oelmüller, Ralf (2006): pTAC2, -6 and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression, *Plant Cell* 18 [1], Seite 176-197. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/18/1/176>
- Pfannschmidt, T. und Link, G. (1994): Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, *Plant Molecular Biology* 25 [1], Seite 69-81. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8003698>

- Pfannschmidt, T. und Link, G. (1997): The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context, *Molecular & General Genetics* 257, Seite 35-44. URL: <http://www.springerlink.com/content/lb8x3aedtex5nnc9/>
- Pfannschmidt, Thomas und Liere, Karsten (2005): Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression, *Antioxidants & Redox Signaling* 7 [5-6], Seite 607-618. URL: <http://www.liebertonline.com/loi/ars>
- Pfannschmidt, Thomas; Ogrzewalla, Karsten; Baginsky, Sacha; Sickmann, Albert; Meyer, Helmut E. und Link, Gerhard (2000): The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.): Integration of a prokaryotic core into a larger complex with organelle-specific functions, *European Journal of Biochemistry* 267 [1], Seite 253-261. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601874>
- Pfeuty, A.; C., Dufresne; M., Gueride und G., Lecellier (2006): Mitochondrial upstream promoter sequences modulate *in vivo* the transcription of a gene in yeast mitochondria, *Mitochondrion* 6 [6], Seite 289-298. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110175>
- Phinney, B. S. und Thelen, J. J. (2005): Proteomic characterization of a triton-insoluble fraction from chloroplasts defines a novel group of proteins associated with macromolecular structures, *Journal of Proteome Research* 4 [2], Seite 497-506. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15822927
- Pogson, Barry J. ; Woo, Nick S. ; Förster, Britta und Small, Ian D. (2008): Plastid signalling to the nucleus and beyond *Trends in Plant Science* 13 [11], Seite 602-609. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838332>
- Portugal, J. und Rodriguez-Campos, A. (1996): T7 RNA polymerase cannot transcribe through a highly knotted DNA template, *Nucleic Acids Research* 24 [24], Seite 4890-4894. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/24/24/4890>
- Poyton, R. O. und McEwen, J. E. (1996): Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes, *Annu Rev Biochem* 65, Seite 563-607. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8811190
- Pring, D. R.; Mullen, J. A. und Kempken, F. (1992): Conserved sequence blocks 5' to start codons of plant mitochondrial genes, *Plant Molecular Biology* 19 [2], Seite 313-317. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00027353>
- Privat, I.; Hakimi, M. A.; Buhot, L.; Favory, J. J. und Mache-Lerbs, S. (2003): Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3, *Plant Molecular Biology* 51 [3], Seite 385-399. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12602869
- Purton, S. und Gray, J. C. (1989): The plastid *rpoA* gene encoding a protein homologous to the bacterial RNA polymerase alpha subunit is expressed in pea chloroplasts, *Molecular & General Genetics* 217 [1], Seite 77-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2671652
- Rapp, J. C.; Baumgartner, B. J. und Mullet, J. (1992): Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. Transcription rates and mRNA levels vary over 300-fold; predicted mRNA stabilities vary 30-fold, *Journal of Biological Chemistry* 267 [30], Seite 21404-21411. URL: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/267/30/21404>
- Rapp, W. D. ; Lupold, D. S. ; Mack, S. und Stern, D. B. (1993): Architecture of the maize mitochondrial *atp1* promoter as determined by linker-scanning and point mutagenesis, *Molecular and Cellular Biology* 13 [12], Seite 7232-7238. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=364793>
- Rapp, W. D. und Stern, D. B. (1992): A conserved 11 nucleotide sequence contains an essential promoter element of the maize mitochondrial *atp1* gene, *EMBO Journal* 11 [3], Seite 1065-1073. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=556547>

- Richly, Erik und Leister, Dario (2004): An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of Arabidopsis and rice, Gene 329, Seite 11-16. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033524>
- Richter, U.; Kiessling, J.; Hedtke, B.; Decker, E.; Reski, R.; Borner, T. und Weihe, A. (2002): Two RpoT genes of *Physcomitrella patens* encode phage-type RNA polymerases with dual targeting to mitochondria and plastids, Gene 290 [1-2], Seite 95-105. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12062804
- Roberti, Marina; Bruni, Francesco; Polosa, Paola Loguercio; Gadaleta, Maria Nicola und Cantatore, Palmiro (2006): The Drosophila termination factor DmTTF regulates *in vivo* mitochondrial transcription, Nucleic Acids Research 34 [7], Seite 2109-2116. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/34/7/2109>
- Roberti, Marina; Polosa, Paola Loguercio; Bruni, Francesco; Musicco, Clara; Gadaleta, Maria Nicola und Cantatore, Palmiro (2003): DmTTF, a novel mitochondrial transcription termination factor that recognises two sequences of Drosophila melanogaster mitochondrial DNA, Nucleic Acids Research 31 [6], Seite 1597-1604. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/31/6/1597>
- Rochaix, J. D. (1997): Chloroplast reverse genetics - New insights into the function of plastid, Trends in Plant Science 2 [11], Seite 419-425. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD1-49T53H0-8&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=8566bbf34b6ea774943af2a622362776
- Rodermel, S. (2001): Pathways of plastid-to-nucleus signaling, Trends Plant Sci 6 [10], Seite 471-478. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11590066
- Rogalski, Marcelo; Ruf, Stephanie und Bock, Ralph (2006): Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival, Nucleic Acids Research 34 [16], Seite 4537-4545. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/34/16/4537>
- Rousvoal, S.; Oudot, M. -P.; Fontaine, J. -M.; Kloareg, B. und Goer, S. Loiseaux-de (1998): Witnessing the evolution of transcription in mitochondria: The mitochondrial genome of the primitive brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. encodes a T7-like RNA polymerase, Journal of Molecular Biology 277 [5], Seite 1047-1057. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-45S49S7-FY/2/e5ae04a59af22ca65fe04a2b49c3f733>
- Rozen, Steve und Skaletsky, Helen J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, Krawetz S, Misener S Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology Seite 365-386, Humana Press, Totowa, NJ. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547847>
- Rui, S. und Tse-Dinh, Y. C. (2003): Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge, Frontiers in bioscience 8, Seite 256 - 263.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol Biol Evol. 4 [4], Seite 406-425. URL: <http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/4/4/406>
- Salvador, M.L.; Klein, U. und Bogorad, L. (1998): Endogenous fluctuations of DNA topology in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*, Molecular And Cellular Biology 18 [12], Seite 7235-7242. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/99038228>
- Sambrook, J. und Russell, D. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saraste, M. (1999): Oxidative phosphorylation at the fin de siecle, Science 283 [5407], Seite 1488-1493. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10066163
- Sato, Naoki; Nakayama, M. und Hase, T. (2001): The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase, FEBS Lett 487 [3], Seite 347-350. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11163356
- Sato, Naoki; Terasawa, K.; Miyajima, K. und Kabeya, Y. (2003): Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids, *International Review of Cytology* 232, Seite 217-262. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14711120
- Satoh, Junko; Baba, Kyoko; Nakahira, Yoichi; Tsunoyama, Yuichi; Shiina, Takashi und Toyoshima, Yoshinori (1999): Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases (PEP) in wheat, *Plant Journal* 18 [4], Seite 407-416. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119095756/abstract>
- Schein, Andrew I.; Kissinger, Jessica C. und Ungar, Lyle H. (2001): Chloroplast transit peptide prediction: a peek inside the black box, *Nucleic Acids Research* 29 [16], Seite e82. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/29/16/e82>
- Schinkel, A. H.; Koerkamp, M. J.; Touw, E. P. und Tabak, H. F. (1987): Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and interaction with core RNA polymerase, *J Biol Chem* 262 [26], Seite 12785-12791. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2442167
- Schmitz-Linneweber, Christian und Barkan, Alice (2007): RNA splicing and RNA editing in chloroplasts, *Topics in Current Genetics* 19 Seite 213-248, Springer, Berlin/Heidelberg. URL: <http://www.springerlink.com/content/h3081h74766q7784/>
- Schön, A.; Krupp, G.; Gough, S.; Berry-Lowe, S.; Kannangara, C. G. und Söll, D. (1986): The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA, *Nature* 322 [6076], Seite 281-284. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3637637
- Schönfeld, Christine; Wobbe, Lutz; Borgstadt, Rudiger; Kienast, Alexandra; Nixon, Peter J. und Kruse, Olaf (2004): The Nucleus-encoded Protein MOC1 Is Essential for Mitochondrial Light Acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Journal of Biological Chemistry* 279 [48], Seite 50366-50374. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/279/48/50366>
- Schrubar, H.; Wanner, G. und Westhoff, P. (1990): Transcriptional control of plastid gene expression in greening *sorghum* seedlings, *Planta* 183 [1], Seite 101-111. URL: <http://www.springerlink.com/content/t681703672145184/>
- Schubot, F. D.; Chen, C. J.; Rose, J. P.; Dailey, T. A.; Dailey, H. A. und Wang, B. C. (2001): Crystal structure of the transcription factor sc-mtTFB offers insights into mitochondrial transcription, *Protein Science* 10 [10], Seite 1980-1988. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11567089
- Schwartz, R M und Dayhoff, M O (1978): Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts, *Science* 199 [4327], Seite 395-403. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/202030>
- Schwarz, Christian; Elles, Ingolf; Kortmann, Jens; Piotrowski, Markus und Nickelsen, Jorg (2007): Synthesis of the D2 Protein of Photosystem II in *Chlamydomonas* Is Controlled by a High Molecular Mass Complex Containing the RNA Stabilization Factor Nac2 and the Translational Activator RBP40, *The Plant Cell* 19 [11], Seite 3627-3639. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/19/11/3627>
- Seidel-Rogol, Bonnie L.; McCulloch, Vicki und Shadel, Gerald S. (2003): Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop, *Nature Genetics* 33 [1], Seite 23-24. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496758>
- Sekine, K.; Hase, T. und Sato, N. (2002): Reversible DNA compaction by sulfite reductase regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids, *Journal of Biological Chemistry* 277 [27], Seite 24399-24404. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11997391

- Serino, German und Maliga, Pal (1998): RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme, *Plant Physiology* 117 [4], Seite 1165-1170. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/117/4/1165>
- Shadel, G. S. und Clayton, D. A. (1995): A *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial transcription factor, sc-mtTFB, shares features with sigma factors but is functionally distinct, *Mol Cell Biol* 15 [4], Seite 2101-2108. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7891705
- Shadel, G. S. und Clayton, D. A. (1997): Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates, *Annu Rev Biochem* 66, Seite 409-435. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9242913
- Shadel, Gerald S. und Clayton, David A. (1993): Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation, *Journal of Biological Chemistry* 268 [22], Seite 16083-16086. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8344889
- Shen, E. L. und Bogenhagen, D. F. (2001): Developmentally-regulated packaging of mitochondrial DNA by the HMG-box protein mtTFA during *Xenopus* oogenesis, *Nucleic Acids Res* 29 [13], Seite 2822-2828. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11433028
- Shi, Pei-Yong; Maizels, Nancy und Weiner, Alan M. (1998): CCA addition by tRNA nucleotidyltransferase: polymerization without translocation?, *EMBO Journal* 17 [11], Seite 3197-3206. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1170658>
- Shiina, T.; Allison, L. und Maliga, P. (1998): *rbcL* transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability, *Plant Cell* 10 [10], Seite 1713-22. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/10/10/1713>
- Shiina, Takashi; Tsunoyama, Yuichi; Nakahira, Yoichi und Khan, Muhammad S. (2005): Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants, *International Review of Cytology* 244, Seite 1-68. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CTY-4H2WWR9-1/2/9ad9388c69d3c47b8d0a571f71ec8a7a>
- Shutt, Timothy E. und Gray, Michael W. (2006): Homologs of Mitochondrial Transcription Factor B, Sparsely Distributed Within the Eukaryotic Radiation, Are Likely Derived from the Dimethyladenosine Methyltransferase of the Mitochondrial Endosymbiont, *Molecular Biology and Evolution* 23 [6], Seite 1169-1179. URL: <http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/23/6/1169>
- Siemenroth, A.; Wollgien, R.; Neumann, D. und Börner, T. (1981): Synthesis of ribosomal RNA in ribosome-deficient plastids of the mutant *albostrians* of *Hordeum vulgare* L., *Planta* 153 [6], Seite 547-555. URL: <http://www.springerlink.com/content/mng5g8374m55708g/>
- Silhavy, D. und Maliga, P. (1998): Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojap* maize mutant, *Current Genetics* 33 [5], Seite 340-344. URL: <http://www.springerlink.com/content/pyfdu4and7bvr0x8/>
- Silhavy, D. und Maliga, P. (1998): Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cell culture, *Current Genetics* 34 [1], Seite 67-70. URL: <http://www.springerlink.com/content/duje53dnbpvu6cat>
- Šimková, H. (1998): Methylation of mitochondrial DNA in carrot (*Daucus carota* L.), *Plant Cell Reports* 17 [3], Seite 220-224. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s002990050382>
- Small, I. D. und Peeters, N. (2000): The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins, *Trends Biochem Sci* 25 [2], Seite 46-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10664580
- Small, I.; Peeters, N.; Legeai, F. und Lurin, C. (2004): Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences, *Proteomics* 4 [6], Seite 1581-1590. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15174128

- Smart, C. J.; Moneger, F. und Leaver, C. J. (1994): Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower, *Plant Cell* 6 [6], Seite 811-825. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/6/6/811>
- Song, Hoseok und Kang, Changwon (2001): Sequence-specific termination by T7 RNA polymerase requires formation of paused conformation prior to the point of RNA release, *Genes to Cells* 6 [4], Seite 291-301. URL: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00420.x>
- Sousa, R.; Chung, Y.J.; Rose, J.P. und Wang, B.C. (1993): Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution., *Nature* 364 [6438], Seite 593-9. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/93354440>
- Sriraman, P.; Silhavy, D. und Maliga, P. (1998): The phage-type *PclpP*-53 plastid promotor comprises sequences downstream of the transcription initiation site, *Nucleic Acids Res.* 26 [21], Seite 4874-4879. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147934>
- Sriraman, Priya; Silhavy, Daniel und Maliga, Pal (1998): Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors, *Plant Physiology* 117 [4], Seite 1495-1499. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=34912>
- Steen, R.; Dahlberg, A. E.; Lade, B. N.; Studier, F. W. und Dunn, J. J. (1986): T7 RNA polymerase directed expression of the *Escherichia coli rrnB* operon, *Embo J* 5 [5], Seite 1099-1103. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3013618
- Stern, D. B. ; Higgs, D. C. und Yang, J. J. (1997): Transcription and translation in chloroplasts, *Trends in Plant Science* 2 [8], Seite 308-315.
- Stirdivant, S. M. ; Crossland, L. D. und Bogorad, L. (1985): DNA supercoiling affects in vitro transcription of two maize chloroplast genes differently, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 [15], Seite 4886-90. URL: <http://www.pnas.org/content/82/15/4886.abstract>
- Suck, R. ; Zeltz, P. ; Falk, J. ; Acker, A. ; Kössel, H. und Krupinska, K. (1996): Transcriptionally active chromosomes (TACs) of barley chloroplasts contain the α -subunit of plastome encoded RNA polymerase, *Current Genetics* 30 [6], Seite 515-521. URL: <http://www.springerlink.com/content/1a1t5vnra9h8730b/>
- Sugita, M. und Sugiura, M. (1996): Regulation of gene expression In chloroplasts of higher plants, *Plant Molecular Biology* 32 [1-2], Seite 315-326. URL: <http://www.springerlink.com/content/rw5535235h477383/>
- Sugiura, M. (1995): The chloroplast genome, *Essays Biochem* 30, Seite 49-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8822148
- Sugiyama, Y.; Watase, Y.; Nagase, M.; Makita, N.; Yagura, S.; Hirai, A. und Sugiura, M. (2005): The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants, *Molecular Genetics and Genomics* 272 [6], Seite 603. URL: <http://springerlink.metapress.com/index/10.1007/s00438-004-1075-8>
- Surzycki, S.J. und Shellenbarger, D.L. (1976): Purification and characterization of a putative sigma factor from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 73 [11], Seite 3961-3965. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=431283&blobtype=pdf>
- Suzuki, Jon Y.; Sriraman, Priya; Svab, Zora und Maliga, Pal (2003): Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants, *Plant Cell* 15 [1], Seite 195-205. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/15/1/195>
- Svab, Z. und Maliga, P. (1993): High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, Seite 913-917. URL: <http://www.pnas.org/content/90/3/913.abstract>
- Swiatecka-Hagenbruch, Monika; Emanuel, Carola; Hedtke, Boris; Liere, Karsten und Borner, Thomas (2008): Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase, *Nucleic Acids*

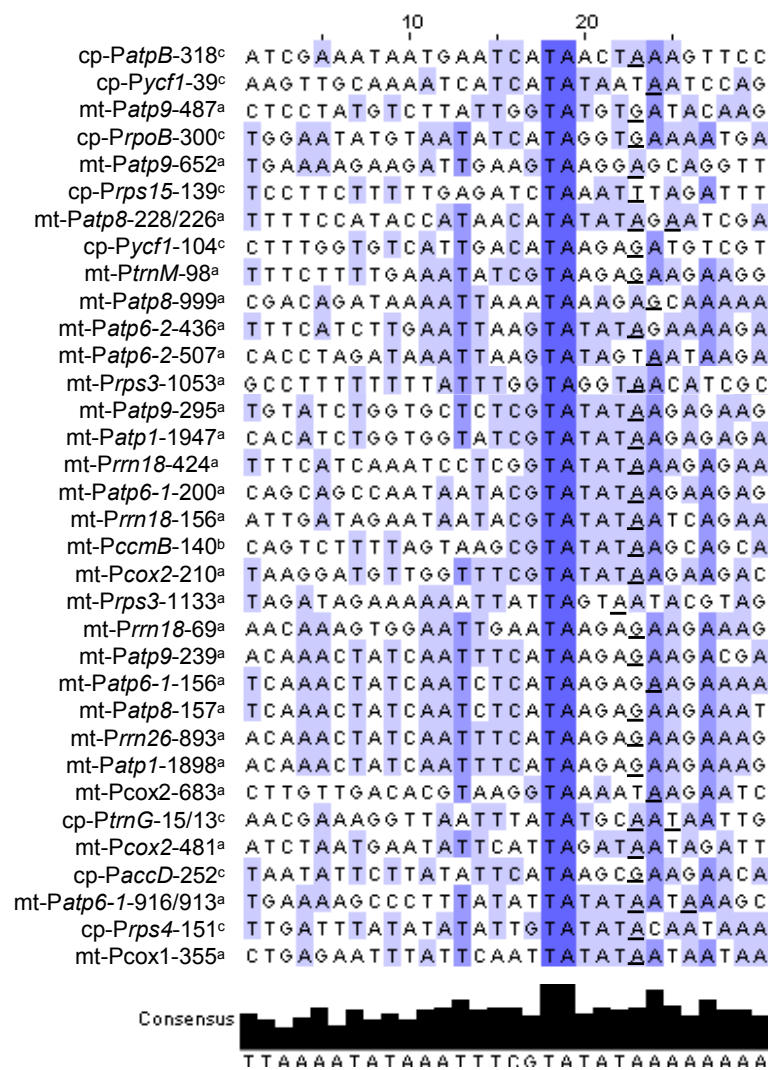
- Research 36 [3], Seite 785-792. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/36/3/785>
- Swiatecka-Hagenbruch, Monika; Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007): High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana*, Molecular Genetics and Genomics 277 [6], Seite 725-734. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-007-0222-4>
- Swiatecka, Monika (2004): Organelläre phagenähnliche RNA-Polymerasen: Transkriptanalyse RpoT-überexprimierender Arabidopsispflanzen, Humboldt-Universität, Berlin.
- Tanaka, K.; Tozawa, Y.; Mochizuki, N.; Shinozaki, K.; Nagatani, A.; Wakasa, K. und Takahashi, H. (1997): Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids, FEBS Letters 413 [2], Seite 309-313. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97424381>
- Tandara, H. (2000): *In vitro*-Transkriptions- und *in vivo*-Importstudien zur Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren pflanzlicher Organellen, Humboldt-Universität, Berlin.
- Tang, Guo-Qing; Bandwar, Rajiv P. und Patel, Smita S. (2005): Extended upstream A-T sequence increases T7 promoter strength, Journal of Biological Chemistry 280 [49], Seite 40707-40713. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/M508013200v1>
- Thum, Karen E.; Kim, Minkyun; Morishige, Daryl T.; Eibl, Christian; Koop, Hans-Ulrich und Mullet, John E. (2001): Analysis of barley chloroplast *psbD* light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco, Plant Molecular Biology 47 [3], Seite 353-366. URL: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011616400264>
- Tiller, K. und Link, G. (1993): Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard (*Sinapis alba* L.), EMBO Journal 12 [5], Seite 1745-1753. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413393>
- Timmis, J. N.; Ayliffe, M. A.; Huang, C. Y. und Martin, W. (2004): Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes, Nat Rev Genet 5 [2], Seite 123-135. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14735123
- Tiranti, V.; Savoia, A.; Forti, F.; D'Apolito, M. F.; Centra, M.; Rocchi, M. und Zeviani, M. (1997): Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPO) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database, Hum Mol Genet 6 [4], Seite 615-625. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9097968
- Tokuhisa, James G.; Vijayan, Perumal; Feldmann, Kenneth A. und Browse, John A. (1998): Chloroplast development at low temperatures requires a homolog of DIM1, a yeast gene encoding the 18S rRNA dimethylase, Plant Cell 10 [5], Seite 699-712. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/10/5/699>
- Topping, Jennifer und Leaver, Christopher (1990): Mitochondrial gene expression during wheat leaf development, Planta 182 [3], Seite 399-407. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02411391>
- Tracy, R. L. und Stern, D. B. (1995): Mitochondrial transcription initiation: promoter structures and RNA polymerases, Current Genetics 28 [3], Seite 205-216. URL: <http://www.springerlink.com/content/m2966uv60174035p/>
- Tregoning, John S.; Nixon, Peter; Kuroda, Hiroshi; Svab, Zora; Clare, Simon; Bowe, Frances; Fairweather, Neil; Ytterberg, Jimmy; Wijk, Klaas J. van; Dougan, Gordon und Maliga, Pal (2003): Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts, Nucleic Acids Research 31 [4], Seite 1174-1179. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/31/4/1174>
- Trifa, Y.; Privat, I.; Gagnon, J.; Baeza, L. und Lerbs-Mache, S. (1998): The nuclear *RPL4* gene encodes a chloroplast protein that co-purifies with the T7-like transcription complex as well as plastid ribosomes, Journal of Biological Chemistry 273 [7], Seite 3980-3985. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98129805>
- Tsunoyama, Y.; Ishizaki, Y.; Morikawa, K.; Kobori, M.; Nakahira, Y.; Takeba, G.; Toyoshima, Y. und Shiina, T. (2004): Blue light-induced transcription of plastid-encoded *psbD* gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 [9], Seite 3304-3309. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14976253
- Tsunoyama, Y.; Morikawa, K.; Shiina, T. und Toyoshima, Y. (2002): Blue light specific and differential expression of a plastid sigma factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*, FEBS Letters 516 [1-3], Seite 225-228. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11959137
- Unseld, M.; Marienfeld, J. R.; Brandt, P. und Brennicke, A. (1997): The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides, Nature Genetics 15 [1], Seite 57-61. URL: <http://www.nature.com/ng/journal/v15/n1/abs/ng0197-57.html>
- Vera, A.; Hirose, T. und Sugiura, M. (1996): A ribosomal protein gene (*rpl32*) from tobacco chloroplast DNA is transcribed from alternative promoters - similarities in promoter region organization in plastid housekeeping genes, Molecular & General Genetics 251 [5], Seite 518-525. URL: <http://www.springerlink.com/content/g800whh86x884577/>
- Veronico, P.; Gallerani, R. und Ceci, L. R. (1996): Compilation and classification of higher plant mitochondrial tRNA genes, Nucleic Acids Research 24 [12], Seite 2199-2203. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/24/12/2199>
- Wakasugi, T.; Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (2001): The genomics of land plant chloroplasts: Gene content and alteration of genomic information by RNA editing, Photosynthesis Res. 70 [1], Seite 107-118. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16228365>
- Wang, J.C. und Lynch, A.S. (1996): Effects of DNA supercoiling on gene expression, Lin E.C.C., Lynch A.S., Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. Seite 127-147, R.G. Landes Company, Austin TX
- Ward, B. L.; Anderson, R. S. und Bendich, A. J. (1981): The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (*cucurbitaceae*), Cell 25 [3], Seite 793-803. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6269758
- Watson, Jennifer; Koya, Vijay; Leppla, Stephen H. und Daniell, Henry (2004): Expression of Bacillus anthracis protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop, Vaccine 22 [31-32], Seite 4374-4384. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TD4-4C47D57-2/2/c79a007897946bb8a31eaf75741a5e2d>
- Weihe, A.; Hedtke, B. und Börner, T. (1997): Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*, Nucleic Acids Research 25 [12], Seite 2319-2325. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97315321>
- Weihe, Andreas (2004): The transcription of plant organelle genomes, Daniell, Henry und Chase, Christine D., Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles Seite 213-237, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. URL: <http://www.springerlink.com/content/r20nj7455x212101/>
- Weihe, Andreas und Börner, Thomas (1999): Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts, Trends in Plant Science 4 [5], Seite 169-170. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD1-3WRB3CC-1C&_user=10&_rdoc=1&_fnt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7962dc03e3d1bd7ae1c1af55020e5148
- Winkley, C. S. ; Keller, M. J. und Jaehning, J. A. (1985): A multicomponent mitochondrial RNA polymerase from *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biological Chemistry 260 [26], Seite 14214-14223. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/260/26/14214>
- Wu, C.Y.; Lin, C.H. und Chen, L.J. (1997): Identification of the transcription start site for the spinach chloroplast serine tRNA gene, FEBS Letters 418 [1-2], Seite 157-61. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98074928>
- Xie, G. und Allison, L. A. (2002): Sequences upstream of the YRTA core region are essential for transcription of the tobacco *atpB* NEP promoter in chloroplasts *in vivo*, Current Genetics 41 [3], Seite 176-82. URL: <http://www.springerlink.com/content/37w70hvdkg8tlqy/?p=d94933ce338f4befaaac1b618e8e362f&pi=0>

- Xu, B. und Clayton, D. A. (1992): Assignment of a yeast protein necessary for mitochondrial transcription initiation, *Nucleic Acids Res* 20 [5], Seite 1053-1059. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1549466
- Yang, D.; Oyaizu, Y.; Oyaizu, H.; Olsen, G. J. und Woese, C. R. (1985): Mitochondrial origins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [13], Seite 4443-4447. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3892535
- Yao, Junlan; Roy-Chowdhury, Sanchita und Allison, Lori A. (2003): AtSig5 is an essential nucleus-encoded Arabidopsis σ -like factor, *Plant Physiology* 132 [2], Seite 739-747. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/132/2/739>
- Young, D.A.; Allen, R.L.; Harvey, A.J. und Lonsdale, D.M. (1998): Characterization of a gene encoding a single-subunit bacteriophage-type RNA polymerase from maize which is alternatively spliced, *Molecular And General Genetics* 260 [1], Seite 30-37. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/99045290>
- Young, R. A. (1979): Transcription termination in the *Escherichia coli* ribosomal RNA operon *rrnC*, *Journal of Biological Chemistry* 254 [24], Seite 12725-12731. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/254/24/12725>
- Zandueta-Criado, Aitor und Bock, Ralph (2004): Surprising features of plastid *ndhD* transcripts: addition of non-encoded nucleotides and polysome association of mRNAs with an unedited start codon, *Nucleic Acids Research* 32 [2], Seite 542-550. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/32/2/542>
- Zerges, William (2000): Translation in chloroplasts, *Biochimie* 82 [6-7], Seite 583-601. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VRJ-45538PT-7/2/15de01a317ee59a56adcf02fdcf8f2a7>
- Zoeger, A. (2001): Charakterisierung einer Phagen-Typ RNA-Polymerase aus *Chlamydomonas reinhardtii*, Diplomarbeit, Humboldt Universität, Berlin.
- Zoschke, Reimo; Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007): From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development, *Plant Journal* 50 [4], Seite 710-722. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-313X.2007.03084.x>
- Zubko, Mikhajlo K. und Day, Anil (1998): Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome free plastid inheritance, *Plant Journal* 15 [2], Seite 265-271. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-313X.1998.00195.x/abs>

6 ANHANG

Anhang 1: Für die Ähnlichkeitsanalyse in Abbildung 41: verwendete organelläre Promotorsequenzen aus *Arabidopsis thaliana*. Das multiple Alignment wurde mit Hilfe des Programms MUSCLE [http://www.drive5.com/muscle/, Edgar, 2004] erstellt und manuell modifiziert. *In vivo* bestimmte Transkriptionsinitiationsorte mitochondrialer und plastidärer Promotoren sind in der Sequenz, die Promotorkernsequenz ist in der Konsensussequenz unterstrichen. Die kartierten Promotoren sind den folgenden Veröffentlichungen entnommen: ^aKühn et al. [2005], ^bForner et al. (2007), ^cSwiatecka-Hagenbruch et al. [2007].



WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

in wissenschaftlichen Zeitschriften

Bohne, A.-V., Weihe, A., Börner, T. (2009). Transfer RNAs inhibit Arabidopsis phage-type RNA polymerases. *Endocytobiosis and Cell Research*, 19:63-69

Bohne, A.-V., Ruf, S., Börner, T., Bock, R. (2007). Faithful transcription initiation from a mitochondrial promoter in transgenic plastids. *Nucleic acids research*, 35(21): 7256-7266.

Meixner M.J., Lüter C., Eckert C., Itskovich V., Janussen D., von Rintelen T., **Bohne A.-V.**, Meixner J.M., Hess W.R. (2007) Phylogenetic analysis of freshwater sponges provide evidence for endemism and radiation in ancient lakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(3): 875-886.

Kühn, K. und **Bohne, A.-V.**, Liere, K., Weihe, A., Börner, T. (2007). Arabidopsis phage-type RNA polymerases: accurate *in vitro* transcription of organellar genes. *The Plant Cell*, 19(3): 959–971.

Bohne, A.-V., Irihimovitch, V., Weihe A., Stern, D.B. (2006). *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a single sigma⁷⁰-like factor which likely functions in chloroplast transcription. *Current Genetics*, 49(5): 333–340.

Konferenz-Vorträge

Bohne, A.-V., Kühn, K., Liere, K., Weihe, A., Börner, T. (Sept./Okt. 2006). Akkurate *in vitro*-Transkription organellärer Gene durch Phagentyp-RNA-Polymerasen in *Arabidopsis thaliana*. ISE-G-Tagung, Marburg, Deutschland.

Bohne, A.-V., Kühn, K., Liere, K., Weihe, A., Börner, T. (Dez. 2005). Organellar RNA-polymerases recognize promoter motifs *in vitro*. XVI. Berliner Bot. Graduierten-Kolloquium, Havel-Spree-Kolloquium, Potsdam, Deutschland.

Konferenz-Poster

Bohne, A.-V., Ruf, S., Börner, T., Bock, R. (Sept. 2007). Similarities of the transcriptional systems in chloroplasts and mitochondria. 10th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Gmunden, Österreich.

Bohne, A.-V., Ruf, S., Börner, T., Bock, R. (Sept. 2007). Similarities of the transcriptional systems in chloroplasts and mitochondria. Botanikertagung, Hamburg, Deutschland.

Bohne, A.-V., Kühn, K., Liere, K., Weihe, A., Börner, T. (Sept. 2006). Accurate *in vitro* transcription of organellar genes by phage-type RNA-polymerases in Arabidopsis Plant Genetics Conference, Joint conference of the German Genetics Society and the German Society for Plant Breeding, Kiel, Deutschland.

Bohne, A.-V., Kühn, K., Liere, K., Weihe, A., Börner, T. (April 2006). Transcription of chloroplast and mitochondrial genes: Phage-type RNA-polymerases recognize promoter motifs *in vitro*. 3rd Symposium "Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism" of the Collaborative Research Center SFB 429, Potsdam, Deutschland.

DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Thomas Börner für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl dieses interessante Thema zu bearbeiten, seine Unterstützung und wertvollen Anregungen sowie die zahlreichen Möglichkeiten meine Arbeiten selbständig zu vertreten.

Für die finanzielle Förderung der Arbeit möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken.

Meinen Projektleitern Dr. Karsten Liere und Dr. Andreas Weihe danke ich für vielfältige praktische Ratschläge und gedanklichen Austausch. Bei Karsten möchte ich mich zudem ganz besonders für seine stets vorhandene, wortlose Hilfsbereitschaft, die kritische Durchsicht dieser Arbeit und das Teilen seiner vielfältigen Erfahrungen bedanken.

Dr. Stephanie Ruf und Professor Ralph Bock möchte ich für die Zusammenarbeit sowie die Bereitstellung der Tabakmutanten danken.

Besonders bedanken möchte ich auch bei allen Mitarbeitern der dritten Etage für ein freundliches und motivierendes Arbeitsumfeld. Ganz besonderer Dank gilt dabei dem Labor 3 für die freundschaftliche Atmosphäre und zahlreiche innovative Abenteuer außerhalb des Labors. Im einzelnen danke ich vielmals Dr. Carola Emanuel für die Einführung in die große Welt der Pflanzen, Dr. Martin Meixner für unzählige Sequenzierungen, Obstteller und fachlichen Rat, Conny Stock und Björn Richter und für ihre praktische Unterstützung im Laboralltag ohne die vieles schwerer gewesen wäre, Uwe Richter für viele anregende Gespräche und seine Hilfe bei phylogenetischen Fragestellungen, Stefanie Hertel für die Auflockerung anstrengender Tage durch die für sie charakteristischen „Stefismen“ und Monika Swiatecka-Hagenbruch und Conny Stock für die kulinarische Versorgung in stressigen Zeiten sowie geistige Aufmunterungen und Unterstützung in allen Lebenslagen. Ich danke Euch allen für eine ganz besondere Zeit!!

Ein herzliches Dankeschön meiner Familie und meinen Freunden für ihre Liebe, Unterstützung und Geduld.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation im Fach Biologie eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 20.04.2009